

LE DOSAGE DU CHOLESTEROL DANS LES FRACTIONS DU SERUM OBTENUES PAR ELECTROPHORESE

THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE
PHARMACIE DE NANCY, POUR
OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE NANCY, MENTION
PHARMACIE, PAR **Francine GENETET**
PHARMACIEN, CHEF DE TRAVAUX
PRATIQUES (DÉLÉGUÉ) A LA FACULTE
DE MÉDECINE DE NANCY, NÉE LE
16 AOUT 1935, A GENÈVE (SUISSE).

SOUTENUE LE 1^{er} FÉVRIER 1964, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse :

Président . . . : Monsieur le Doyen KAYSER

*Juges . . . : M^{lle} BESSON, Professeur
M. PIERFITTE, Maître de Conférence*

*Adjoint au Jury : M. WOLFF, Professeur à la Faculté
de Médecine de Nancy.*

UDART & CLEMENT

RELIEURS

11, RUE SAINTE-ANNE, 11

TÉLÉPH. 52.80.09 - NANCY



LE DOSAGE DU CHOLESTEROL DANS LES FRACTIONS DU SERUM OBTENUES PAR ELECTROPHORESE

THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE
PHARMACIE DE NANCY, POUR
OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE NANCY, MENTION
PHARMACIE, PAR **Francine GENETET**
PHARMACIEN, CHEF DE TRAVAUX
PRATIQUES (DÉLÉGUÉ) A LA FACULTE
DE MÉDECINE DE NANCY, NÉE LE
16 AOUT 1935, A GENÈVE (SUISSE).

SOUTENUE LE 1^{er} FÉVRIER 1964, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse :

Président . . . : Monsieur le Doyen KAYSER

*Juges . . . : M^{lle} BESSON, Professeur
M. PIERFITTE, Maître de Conférence*

*Adjoint au Jury : M. WOLFF, Professeur à la Faculté
de Médecine de Nancy.*

FACULTE DE PHARMACIE
UNIVERSITE DE NANCY

---:---:---:---:---

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : A. BERNANOSE

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE PRINCIPAL

B. SEUROT

Personnel enseignant

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J. G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences naturelles
	BLOCH J. M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSION S.	Pharmacodynamie

Professeur Sans Chaire

M.	BENE R.	C. E. S. Microbiologie
----	---------	------------------------

Maîtres de Conférences-Agrégés

MM.	MIRJOLET M.	Sciences physicochimiques
	PELT J. M.	Matière médicale
	PIERFITTE M.	Chimie biologique

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Melle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique

MM. FRANQUET R.
 MARCHAL J. G.
 STEIMETZ E.
 BLOCH J. M.
 SOLEIL J.
 BERNANOSE A.

Cryptogamie
 Parasitologie
 Mycologie-Minéralogie
 Chimie minérale
 Chimie organique
 - Optique et Acoustique
 - Mathématiques préparatoires
 aux sciences physiques
 - Application thérapeutique
 de la pharmacodynamie

Melle BESSON S.

MM. LAGARDE (Maître de conférence
 à la Faculté de Droit)

BENE R.
 MIRJOLET M.
 PIERFITTE M.
 ANZIANI P.

Mme LASSEUR A.
 Melle GIRARD Th.

Mme BALDO S.

Déontologie
 Bactériologie
 Chimie analytique
 C. E. S. Chimie Biologique
 Caractères analytiques des sels
 Techniques spéciales d'analyses
 Techniques du diagnostic
 bactériologique au laboratoire
 Techniques des examens
 parasitologiques et de l'analyse
 coprologique

Chefs de Travaux

M. ANZIANI P.
 Mme LASSEUR A.
 Melle GIRARD Th. (Délégué)
 MM. AIMOND P. "
 HAYON J. Cl. "
 CHASTE J. "
 BONALY R. "
 RENSON F. "

Chimie
 Microbiologie-Parasitologie
 Microbiologie C. E. S.
 Chimie
 Micrographie
 Sciences pharmaceutiques
 Chimie biologique
 Physique

Doyens honoraires : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier
 M. KAYSER, Professeur à la Faculté de Pharmacie
 de NANCY.

Professeur honoraire : M. CORDEBARD



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555808_0013

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Doyen KAYSER

Professeur de Chimie à la Faculté de Pharmacie
Officier de la Légion d'Honneur

A NOS JUGES

Mademoiselle S. BESSON

Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie

Monsieur M. PIERFITTE

Maître de Conférence Agrégé de Chimie Biologique

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

Hommage respectueux

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur R. WOLFF

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Médecine

Chevalier de la Légion d'honneur

Sentiments reconnaissants

A MA GRAND MERE

Témoignage d'affection

A MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance
et de ma gratitude

A MON MARI

Un témoignage de mon amour et de mon affectueuse
admiration

A MES FILLES

Avec toute ma tendresse

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

AVANT - PROPOS

Le travail que nous allons exposer, nous a été proposé par Monsieur le Professeur R. WOLFF. Il a été entièrement exécuté sous sa haute direction dans son Laboratoire de Chimie biologique, de la Faculté de Médecine de Nancy.

Nous sommes heureuse d'adresser à notre Maître, Monsieur le Professeur R. WOLFF, toute notre gratitude et notre reconnaissance pour la grande sollicitude qu'il n'a cessé de nous manifester. Il a toujours suivi attentivement nos recherches et c'est grâce à ses conseils à ses suggestions que ce travail a pu être mené à bien.

Qu'il veuille trouver ici une preuve de notre profond attachement.

Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Doyen F. KAYSER qui a toujours fait preuve à notre égard d'une grande bienveillance et nous apprécions l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre Jury de thèse.

Nous remercions Mademoiselle S. BESSON, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy et Monsieur le Professeur Agrégé M. PIERFITTE qui ont bien voulu accepter d'être nos juges.

1^{ère} PARTIE

DESCRIPTION ET MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE
DU CHOLESTEROL SUR ELECTROPHEROGRAMME

— INTRODUCTION —

Depuis les premiers travaux d'ANITSCHOW (1913) qui provoqua l'apparition de lésions athéromateuses chez des lapins en les soumettant à un régime riche en cholestérol, on sait qu'il y a un lien étroit entre l'athérosclérose et le métabolisme lipidique. Dans tous les cas de syndromes athéroscléreux reconnus, c'est-à-dire s'étant traduit par des manifestations cliniques, on a trouvé des perturbations du métabolisme des lipides; il s'agit presque toujours d'une augmentation du taux des lipides, notamment du cholestérol. On connaît mieux les variations du cholestérol que celles des autres fractions lipidiques grâce aux nombreux dosages qui ont été mis au point (LIEBERMAN, SCHOENHEIMER, TSCHUGAEFF, PEARSON). Cependant, les phénomènes ne sont pas aussi simples, et si, statistiquement, on peut dire que dans l'athérosclérose il y a augmentation du taux des lipides et du cholestérol, lorsqu'on considère les résultats individuels, on s'aperçoit que dans certains cas, il y a un taux de cholestérol voisin de la normale, alors que pour d'autres le cholestérol est très élevé sans symptôme clinique.

Comme les premières manifestations de l'athérosclérose sont graves d'emblée, les différents chercheurs se sont attachés à trouver des indices simples permettant de faire un diagnostic précoce.

Ils ont étudié les variations du rapport cholestérol libre sur cholestérol estérifié (LEVER 1951); du cholestérol total sur phospholipides (GERTLER 1950).

Il est certain que dans beaucoup de cas d'athérosclérose, ces rapports sont perturbés, mais ceci n'a rien d'absolu.

JONES et GOFMAN (1951) abandonnant le cholestérol ont étudié les perturbations des lipoprotéines. Ils ont séparé par ultracentrifugation analytique les lipoprotéines d'après leurs différentes densités et ils ont constaté que chez les athéroscléreux les lipoprotéines S_f 12-20 étaient très largement augmentées - il s'agit de lipoprotéines de faible densité.

D'autres auteurs (RUSS 1951 - BARR 1951) appliquant la méthode de fractionnement de COHN (1950) ont déterminé les variations que subissaient les différents groupes de protéines au cours de l'athérosclérose .

Ces variations des protéines et lipoprotéines ont également été étudiées chez l'animal (SOULIER 1953) .

Reprenant les études menées sur le cholestérol, nous nous sommes proposé comme but dans ce travail, la mise au point et l'application d'une méthode de dosage du cholestérol permettant l'investigation détaillée de la répartition du cholestérol sur une bande d'électrophorèse .

Ainsi, dans une première partie, nous exposerons l'ensemble des recherches techniques : le fractionnement du cholestérol total en ses différentes composantes en utilisant la séparation électrophorétique en tampon T.E.B. . Nous préciserons les conditions opératoires tant pour l'électrophorèse que pour le dosage du cholestérol.

Dans une seconde partie consacrée au sujet normal, nous donnerons les résultats obtenus en les comparant à ceux d'autres auteurs qui emploient des techniques différentes de séparation .

Dans une troisième partie, nous relaterons les recherches effectuées sur l'animal, d'une part chez l'animal normal, d'autre part chez l'animal en état d'hyperlipémie expérimentale .

HISTORIQUE

Nous ne rappellerons ici que les méthodes utilisant comme point de départ le dosage du cholestérol après séparation électrophorétique du sérum

G.S. BOYD (1954) après électrophorèse du sérum, découpe la bande de papier en petites bandelettes qu'il élue avec un mélange acétone - éthanol . Puis il fait un dosage colorimétrique du cholestérol en utilisant comme réactifs de l'acide acétique plus un mélange anhydride acétique-acide sulfurique .

D'autres auteurs DANGERFIELD et SMITH (1955) ne passent pas par le stade de l'élution et pratiquent la réaction de LIEBERMANN BUCHARD directement sur la bande d'électrophorèse . Cette méthode donne une localisation du cholestérol sur les bandes mais elle ne permet pas d'obtenir des résultats quantitatifs . De plus elle est difficile à mettre en oeuvre , il faut opérer en absence totale d'humidité .

LANGAN, DURRUM et JENCKS (1955) font un dosage de cholestérol dans les α et β lipoprotéines séparées par électrophorèse . Ils éluent le cholestérol de ces deux fractions à l'aide d'un solvant constitué de chloroforme (2 parties) et de méthanol (1 partie) . L'extraction se fait à chaud (72°) pendant plusieurs heures . Puis, ces auteurs appliquent la méthode de ZLATKIS, ZAK et BOYLE (1953) modifiée .

Il faut rappeler encore la méthode décrite par SEARCY et coll. (1960-1961) . Ces auteurs situent, sur une bande d'électrophorèse, les zones contenant du cholestérol en immergeant la bande dans une solution 0,05 M de HCl contenant 5 mg % de protoporphyrine IX, ils rincent, sèchent puis lisent la bande en lumière ultra-violette, il apparaît en fluorescence rouge, deux zones distinctes qui correspondent au cholestérol situé dans les α et les β lipoprotéines . Ces deux fractions sont découpées et le cholestérol est élué avec de l'acide acétique pur saturé en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Il se développe une coloration rose par addition de H_2SO_4 pur .

On pourrait également citer les travaux de :

BLOMBERG, JANKELOWITZ et LAZARUS (1955)

NURY et SMITH (1957)

CRAWFORD (1959)

ANDERSON et KEYS (1956)

tous ces auteurs déterminent après électrophorèse le taux de cholestérol dans les α et β lipoprotéines .

Il faut noter que tous ces chercheurs déterminent le taux de cholestérol des α et β lipoprotéines séparées par électrophorèse de zone en tampon Véronal .

Dans les recherches exposées dans ce travail, nous nous sommes proposée de mettre au point à la fois une méthode facile et rapide, et également une méthode qui permettrait une investigation plus précise de la répartition du cholestérol dans les différentes fractions électrophorétiques du sérum .

II . ELECTROPHORESE

A . MATERIEL - REACTIFS

Le point de départ de notre travail étant la bande d'électrophérogramme , il est justifié d'exposer tout d'abord la technique d'électrophorèse employée et nous dirons pourquoi nous l'avons préférée à d'autres .

1) APPAREIL

Nous avons utilisé l'appareillage SPINCO .

Il s'agit d'une application de la méthode de la chambre humide décrite par DURRUM .

L'appareil est représenté par un système clos constitué par un bac et un couvercle de résine synthétique . Le bac est séparé en deux par une cloison percée d'un trou , ce qui permet d'équilibrer le niveau du tampon de part et d'autre . L'ajustement des deux niveaux a une grande importance . Les bandes , au nombre de 8 , sont disposées sur un chevalet et leurs extrémités viennent s'appuyer sur deux papiers filtre épais . Ainsi , lorsque nous retirons les bandes , elles ne conservent pas de tampon en excès . Une électrode de platine couvre la longueur de la chambre à électrophorèse donnant ainsi une intensité de courant égale pour chaque papier .

Pour faire une série d'électrophorèses , nous procédons de la façon suivante :

Huit bandes de papier sont accrochées sur le support - il est indispensable que toutes les places du support soient occupées , s'il en était autrement l'intensité du courant serait différente dans chaque bandes , de celle normalement prévue-. Le chevalet est introduit dans la cuve à électrophorèse , les bandes sont imprégnées de solution tampon et nous appliquons leurs extrémités sur la bande de papier filtre épais en prenant soin de ne pas **gaufre** le papier . Nous réajustons le couvercle et laissons l'appareil au repos environ un quart d'heure afin que le tampon en excès s'écoule et que les bandes soient uniformément imprégnées .

Puis nous disposons au sommet de chaque bande 40 μ l de sérum, prélevés à la micropipette avec un applicateur constitué de deux fils parallèles (de longueur légèrement inférieure à la largeur de la bande), entre lesquels on forme un film de sérum . On répète l'opération jusqu'à ce que tout le sérum soit réparti en un dépôt linéaire et homogène .

Pour chaque sérum, nous préparons quatres bandes, une qui servira au protéinogramme, une seconde qui donnera le lipidogramme, les deux dernières réservées au dosage du cholestérol .

L'électrophorèse dure 19 heures, sous un voltage de 70 volts avec un courant continu de 2 mA, 5 . Toute l'électrophorèse se passe en chambre froide à 6  .

Les bandes sont ensuite tranf r es sur un support métallique, séchées à l'étuve à 120  pendant quinze minutes .

2 . PAPIER

On a employé le papier Schleicher et Sch ll n  2043 a MgI de 30 cm, 5 x 3 cm

3 . TAMPON

Le tampon est constitué par une solution à base de Tris . Ce dernier (Tris hydroxy méthyl amino méthane) a été introduit en électrophorèse d'une part par ARONSON et GRONWALL (1957) et par RAPP et MENINGER (1959) d'autre part .

La formule donnée par ARONSON et GRONWALL et que nous avons employée est la suivante :

Tris	60 g.	soit 0,05	M
EDTA	6 g.	soit 0,021	M
Acide Borique	4,6 g.	soit 0,075	M
Eau distillée:	qs 1 000 ml.		

Ce tampon a un pH de 8,9 et une force ionique de 0,08 . Nous le désignerons par la suite comme tampon T.E.B. .

4 . COLORATION

a) Protidogramme

Les protidogrammes ont été colorés par une solution d'amidoschwarz 10 B (GRASSMANN 1951-1952).

Préparation de la solution

10 g d'amidoschwarz sont dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial ; on agite et on complète à 100 ml avec de l'alcool méthylique .

Les bandes sont immergées pendant 10 minutes dans la solution colorante , puis rincées dans quatre bains successifs d'alcool méthylique - acide acétique dans le rapport 9 pour 1 . Le fond des bandes reste coloré en bleu pâle .

Comme le volume du dépôt est de 40 μ l , nous n'avons pas une très bonne séparation des différents constituants . Nous pouvons néanmoins sans difficulté localiser les fractions , albumine, α , β et γ globulines .

b) Lipidogramme

Nous appliquons la coloration à l'Oil red-O en solution alcoolique à 50° . Méthode décrite par DURRUM (1952) et JENCKS (1953) , modifiée par SPINCO (1961).

Préparation de la solution

Nous faisons bouillir 800 ml d'eau distillée et d'autre part 0,8 g du colorant sont dissous dans 1 200 ml d'alcool à 95° . Nous ajoutons les deux solutions dans un grand erlen , nous reportons à ébullition après avoir ajusté un réfrigérant .

Nous laissons refroidir la solution et nous la portons à l'étuve à 37° pendant une nuit en la soumettant à une agitation constante obtenue grâce à un dispositif magnétique .

Le lendemain, la solution est filtrée à l'étuve à 41° . Cette solution est par la suite toujours conservée à 37° . Les lipidogrammes sont révélés par immersion pendant 16 heures dans ce colorant . Puis, les bandes sont rincées sous courant d'eau et séchées à température ordinaire .

5 . LECTURE DES BANDES DU PROTEINOGRAMME ET DU LIPIDOGRAMME

L'intensité de coloration des bandes est en corrélation avec la quantité de protides ou de lipides fixées sur la bande, donc nous pouvons mesurer approximativement les quantités de lipides ou de protides en évaluant la coloration . Pour cela, nous avons utilisé l'intégrateur analytrol spinco modèle R.B. . Cet appareil comprend d'une part un densitomètre qui mesure la quantité de lumière absorbée par le papier placé devant une photocellule ; un dispositif permet de faire passer toute la bande d'électrophorèse devant la cellule . Cet appareil possède d'autre part, un intégrateur qui indique par des dents de scie plus ou moins denses, automatiquement la surface en cm^2 des tracés en cloche du lipidogramme lorsque celui-ci est décomposé en utilisant des parallèles .

B . JUSTIFICATION DE LA METHODE

La technique qui vient d'être décrite a demandé des mises au point et des améliorations . On trouvera dans ce chapitre les recherches expérimentales qui ont abouti à la technique définitive .

1 . LES ELECTROPHORESES SONT PRATIQUEES A LA CHAMBRE FROIDE A 6°

Le principe de la méthode consiste dans le dosage du cholestérol tout le long d'une bande d'électrophorèse ; chaque dosage individuel étant fait en double et les

résultats reportés sur le lipidogramme, il faut donc, pour avoir des résultats superposables, que la migration électrophorétique soit identique pour toutes les bandes.

Première expérience.

Nous avons déposé 40 μ l du même sérum sur chacune des huit bandes que peut contenir la chambre à électrophorèse. Nous faisons migrer pendant 19 heures à température ordinaire. Après séchage les bandes sont colorées à l'Oil red-O.

En mesurant la distance en centimètres du dépôt au sommet du pic des β lipoprotéines, et du dépôt au sommet du pic des α lipoprotéines, nous obtenons les résultats suivants :

TABLEAU N° 1

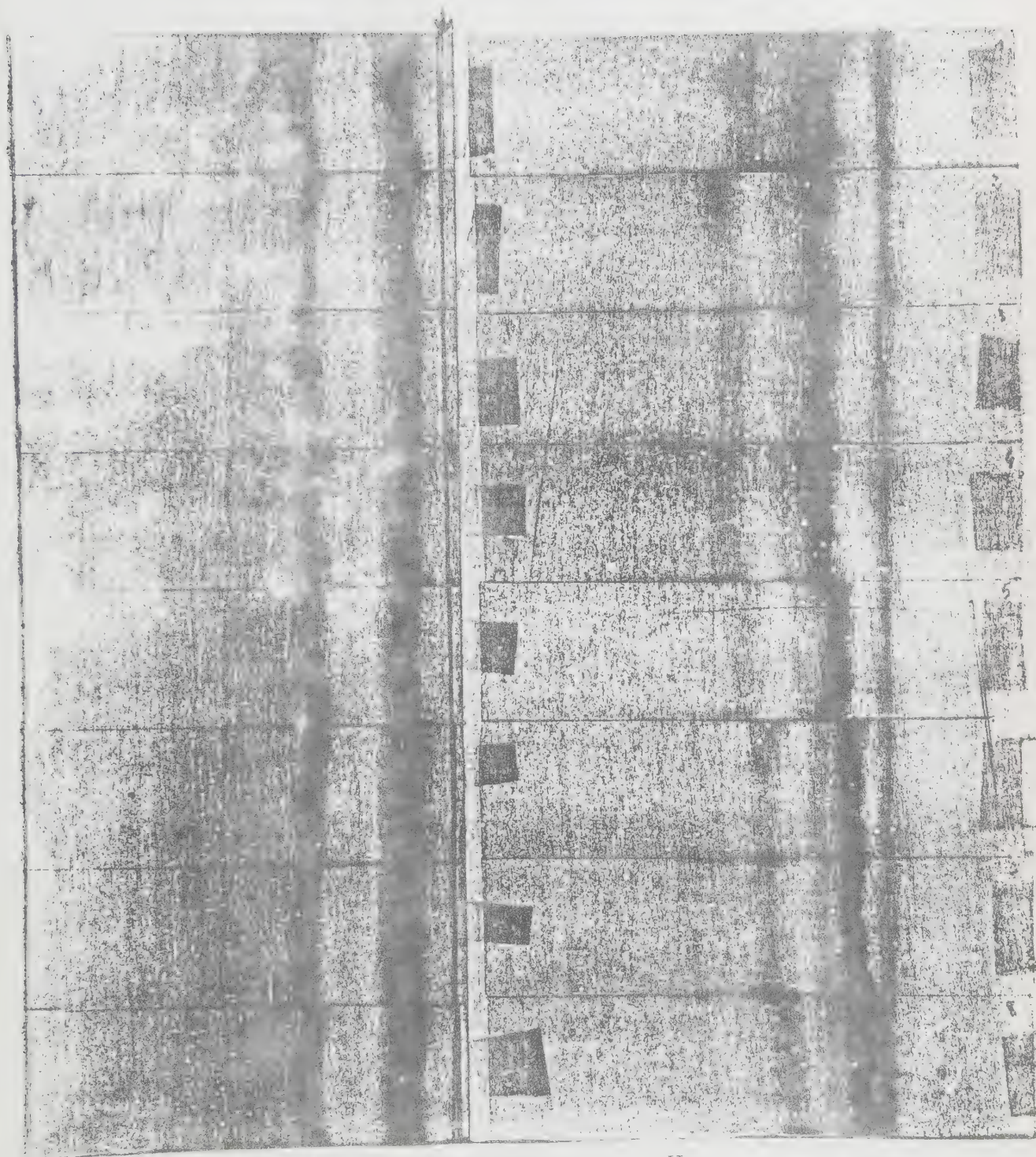
n° de la bande	Distance en cm du dépôt au	
	sommet β	sommet α
1	1,40	3
2	1,45	3,55
3	1,20	3,30
4	1,40	3,50
5	1,20	3,25
6	0,85	2,75
7	0,80	2,55
8	0,55	2,05

On note donc une très grande différence entre la 2ème et la 8ème bande (0,55 - 1,45 ; 2,05 - 3,55). Différence trop importante pour faire des dosages de cholestérol valable.

Deuxième expérience

Nous avons alors réalisé la même expérience mais en transportant l'appareil

Figure 1



Electrophorèse de sérum sur 16 bandes avec tampon T. E. B.

I : température : 6° C

II : température : 18° C

à la chambre froide . La mobilité électrophorétique devient alors constante , ce qui se traduit par les résultats suivants :

TABLEAU N° 2

n° de la bande	Distance en cm du dépôt au	
	sommet β	sommet α
1	1,00	3,30
2	1,05	3,30
3	1,00	3,25
4	1,05	3,30
5	1,10	3,30
6	1,05	3,30
7	1,05	3,30
8	1,05	3,25

2 . COMPARAISON ENTRE TAMPON T.E.B. ET VERONAL

De nombreux autres facteurs influent sur la mobilité électrophorétique .

Le support intervient par sa structure , par les phénomènes électroendosmotiques qu'il suscite , par son pouvoir absorbant (RACADOT 1960) . Le tampon surtout joue un rôle capital , il intervient par son pH qui modifie la charge des protéines , par sa force ionique , par les ions qu'il contient (WUNDERLY 1956) .

Dans la plupart des travaux sur l'électrophorèse les auteurs emploient un tampon à base de Véronal sodique (pH = 8,6 - force ionique 0,10) . La solution T.E.B. utilisée dans ce travail présente de grands avantages . Cette solution a un pH de 8,9 , une force ionique de 0,08 . La mobilité des protéines et des lipoprotéines , donc leur meilleure séparation est inversement proportionnelle à la force ionique , bien qu'on ne puisse descendre au-dessous de certaine limite de l'ordre de 0,05 (RACADOT)

Le pouvoir tampon de cette solution est très élevé . Pour obtenir la même variation de pH il faut ajouter 10 fois plus d'acide chlorhydrique à une solution T.E.B.

qu'à une solution Véronal sodique . Les ions boratés permettent la formation de complexes glucidiques avec la fraction glycoprotéinique et par suite améliorent la mobilité électrophorétique .

L'E.D.T.A. chélate les ions métalliques et permet une meilleure séparation (RACADOT) .

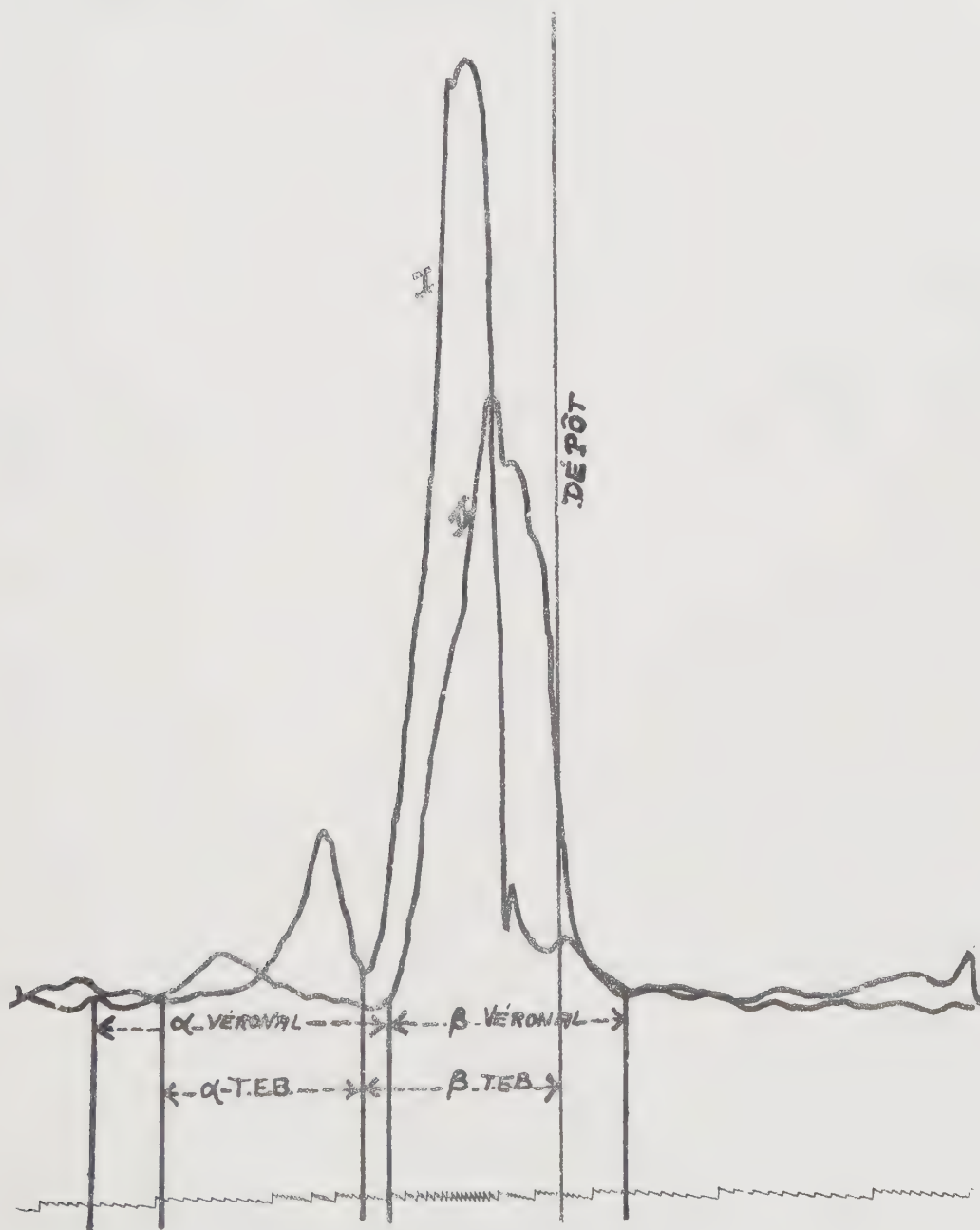
Pratiquement une bande de lipidogramme faite en tampon T.E.B. se présente d'une façon moins étalée que le lipidogramme du même sérum réalisé en tampon véronal . Nous y distinguons en partant de la fraction la plus mobile, une première bande très nette, toujours présente chez les sujets normaux que nous appellerons α lipoprotéines et qui correspond à une partie des albumines et aux α globulines . Séparée de cette première bande par un espace clair (égal ou même quelquefois inférieur à la coloration de fond), nous avons une seconde bande intensément colorée, avec une limite franche du côté du dépôt . Il s'agit des β lipoprotéines qui correspondent à peu près aux β globulines . Il n'y a pas de phénomène de traînée alors qu'en tampon véronal la bande des β lipoprotéines est suivie jusqu'au dépôt d'une traînée de chylomicrons ce qui rend quelquefois ces bandes difficilement interprétables . Ce sont ces résultats qui ont amené RACADOT puis WOLFF, BRIGNON et NICOLAS (1963) à donner la préférence au tampon T.E.B. .

Nous donnons page 13 un graphique dans lequel on a inscrit la courbe du lipidogramme du même sérum en tampon T.E.B. et en tampon véronal . Ce graphique illustre bien les faits signalés plus haut . En tampon véronal l'électrophorèse est plus étalée, la fraction α lipoprotéines n'est pas très nette et les β lipoprotéines vont jusqu'au dépôt . En tampon T.E.B. les fractions α et β lipoprotéines sont très bien différenciées .

De plus il faut ajouter comme autre avantage du tampon T.E.B. que ce dernier, à la différence du véronal, a une très bonne conservation . Il ne se pollue pas et son pH est stable .

Figure 2

Comparaison de deux lipidogrammes de même sérum. L'un a été fait en tampon véronal, l'autre en tampon T.E.B. (d'après WOLFF R., BRIGNON J. J. et NICOLAS J. P.).



Electrophorèse sur papier : - Tampon VERONAL : II
- Tampon T.E.B. : I

3 . LE COLORANT

SWAHN (1953) propose comme colorant des lipides le Noir Soudan , ce qui lui permet une evaluation quantitative des lipides totaux . Nous avons préféré l'Oil red-O recommandé par DURRUM (1952) . Nous avons également pu mettre en évidence une bonne corrélation (WOLFF 1963) entre l'intensité totale de la coloration et la quantité de lipides . De plus la solution Oil red-O présente l'avantage d'une grande stabilité . On peut la conserver plusieurs mois à 37° sans qu'elle ne présente la moindre altération (le Noir Soudan se conserve au maximum 72 heures) . Des enregistrements répétés de lipidogrammes , effectués avec le même sérum conservé au freezer , ont montré qu'avec trois litres de colorant nous pouvons révéler 50 bandes avant qu'il n'y ait la plus petite variation dans l'intensité de la coloration (NICOLAS - communication orale 1963) .

III . DOSAGE DU CHOLESTEROL

Comme pour l'électrophorèse, dans une première partie nous décrirons la technique utilisée, tandis que dans la seconde partie nous justifierons cette méthode .

A . TECHNIQUE DU DOSAGE

Il s'agit d'un dosage colorimétrique . Nous avons repris la technique proposée par ZLATKIS, ZAK et BOYLE (1953), modifiée par HENLY (1957) et ZAK (1957) .

1 . REACTIFS

Ils sont tous conservés à l'obscurité .

a) Acide acétique pur Merck.

b) Solution de perchlorure de fer (FeCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$) à 0,05 % dans l'acide acétique pur . Nous le désignerons au cours de ce travail sous le nom d'éluant ou de réactif au perchlorure de fer.

c) Solution mère de cholestérol - 100 mg de cholestérol dissous dans 100 ml d'acide acétique pur .

d) Solution étalon de cholestérol préparée à partir de la solution mère .
1 ml de la solution c est amené à 25 ml avec le réactif b .

La pureté des réactifs est importante . On sait que très souvent l'acide acétique contient des traces d'acide glyoxylique qui donne avec les protéines et notamment avec le tryptophane des colorations parasites qui gênent le dosage proprement dit ZAK (1957), MAC INTYRE (1954) .

Pour vérifier la pureté des réactifs nous avons procédé de la façon suivante (ASSOUS - GIRARD 1963) . On ajoute 2 ml 8 d'acide acétique à 0.20 ml de sérum non hémolysé - on mélange et on ajoute 2 ml d'acide sulfurique concentré ; on ne doit pas alors avoir une coloration plus intense que celle obtenue en ajoutant 0,20 ml de sérum à 4,8 ml d'acide sulfurique concentré . Si l'acide acétique contient des impuretés il se développe une coloration violette intense .

2 DESCRIPTION DU DOSAGE DU CHOLESTEROL SUR LE SERUM TOTAL (d'après HENLY 1957) .

Dans un tube à centrifuger nous ajoutons à 10 ml du réactif au perchlorure de fer, 0,10 ml de sérum, après avoir mélangé soigneusement nous laissons reposer au minimum 15 minutes, les protéines précipitent . Le rapport quantité de sérum sur quantité de réactif a une grande importance, si nous le faisons varier nous aboutissons à une redissolution des protéines dans l'acide acétique ce qui peut conduire à de graves erreurs dans le dosage (ASSOUS et GIRARD) .

Nous centrifugeons et nous reprenons 5 ml du liquide clair surnageant que nous transférons dans un second tube à centrifuger . Nous préparons également un standard avec 0 10 ml d'eau physiologique dans 10 ml de solution étalon de cholestérol, et un blanc dans un 3ème tube ne contenant que le réactif au perchlorure de fer .

Nous ajoutons dans chacun des trois tubes 3 ml d'acide sulfurique . La homogénéisation du mélange est réalisée par retournements répétés des tubes qui ensuite sont abandonnés une demi-heure à l'obscurité, puis nous lisons le standard et le tube contenant le sérum contre le blanc, au spectrophotomètre BECKMAN à 560 mμ .

Calculs :

La quantité de cholestérol exprimée en g par litre, est donnée par la formule suivante

Lorsque :

Le volume en ml du sérum contenu dans la prise d'essai = 0,05

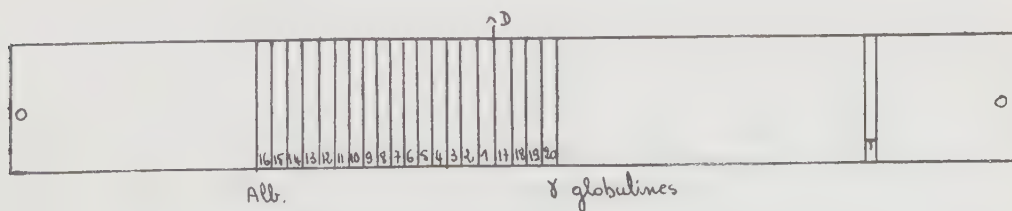
La concentration en g du cholestérol dans la solution étalon = 0,0002 g

$$\text{Cholestérol en g par litre} = \frac{\text{D.O. du sérum}}{\text{D.O. de la solution étalon}} \times \frac{1\,000}{0,05} \times 0,0002$$

$$\text{soit } \frac{\text{D.O. du sérum}}{\text{D.O. de la solution étalon}} \times 4$$

3 . DOSAGE DU CHOLESTEROL DANS LES BANDES D'ELECTROPHORESE

Après électrophorèse, les bandes sont séchées à l'étuve à 120° pendant 15 minutes et découpées en morceau de 5 mm de largeur . Nous découpons 16 bandelettes dans la région allant du dépôt aux albumines, et quatre du dépôt aux γ globulines .



Les bandelettes sont numérotées comme il est indiqué sur le schéma ci-dessus. Chaque morceau de papier est plié en accordéon et déposé dans un tube à hémolyse contenant 1 ml de réactif au perchlorure de Fer . En même temps nous faisons un blanc, c'est-à-dire que nous découpons une bandelette de papier de 5 mm près de l'extrémité cathodique de la bande, à un endroit où le sérum n'a pas migré .

Avec un petit agitateur de verre, nous comprimons à plusieurs reprises les papiers, on a également utilisé un agitateur électrique du type agitateur de Kahn, les résultats sont identiques c'est ce que montre l'expérience suivante.

Expérience :

Nous-faisons 2 séries de dépôts, de 20 μ l chacun d'un sérum contenant 2g03 de cholestérol par litre, sur des bandes d'électrophorèse imprégnées de T.E.B. et séchées . Chaque dépôt a été extrait avec 1 ml d'éluant en utilisant pour une série l'agitateur électrique, pour l'autre la baguette de verre .

Résultats :

TABLEAU 3

Durée d'extraction en minutes.	Cholestérol extrait en g %.	
	Agitation manuelle	Agitation mécanique
30	1,70	1,78
45	1,96	1,95
60	2,06	2,02
90	2,04	2,00

Effet de l'agitation manuelle et de l'agitation mécanique en fonction de la durée d'extraction .

Nous constatons que les résultats sont très voisins . Nous avons choisi pour des raisons de commodité l'agitation électrique , elle demande moins d'intervention .

D'après les résultats donnés dans le tableau 3 , nous pouvons également noter qu'après une heure l'extraction du cholestérol est totale , c'est donc la durée d'élution qui a été choisie .

Lorsque la phase d'élution est terminée , nous prélevons avec une pipette Préciss , 0,80 ml du liquide surnageant , y compris dans le blanc , que nous transférons dans un autre tube à hémolyse . Nous ajoutons à la micro-burette 0,48 ml d'acide sulfurique pur . Chaque tube est convenablement agité .

Dans les mêmes conditions , nous préparons un standard (0,80 ml de la solution étalon et 0,48 ml de SO_4H_2) nous choisissons ces dilutions afin d'obtenir un rapport SO_4H_2 sur réactif au perchlorure de fer : égal à celui donné par Henly : $\frac{5}{3} = \frac{0,8}{0,48}$. Nous abandonnons tous les tubes pendant une demi heure à l'obscurité . Il se développe alors une coloration rose-violacé plus ou moins intense selon la concentration en cholestérol .

La lecture se fait comme pour le dosage du cholestérol total avec le spectrophotomètre Beckman à 560 m μ . Tous les tubes sont lus contre le blanc .

teneur de la solution étalon : 0,000032 g c'est-à-dire la quantité de cholestérol contenu dans 0,80 ml de la solution étalon .

Volume du sérum : une électrophorèse se fait sur 40 μl , que l'on élue dans 20 x 1 ml et on fait le dosage sur 20 x 0,8 = 16 ml
donc la quantité de sérum = $\frac{40 \mu\text{l} \times 16}{20} = 32 \mu\text{l}$ ou 0,032 ml

Cholestérol en g par l. = $\frac{\text{D.O. du sérum}}{\text{D.O. de la solution étalon}} \times \frac{1\ 000}{0,032 \text{ ml}} \times 0,000032 \text{ g}$

$$\text{ou } \frac{\text{D.O. du s\u00e9rum}}{\text{D.O. de la solution \u00e9talon}}$$

Repr\u00e9sentation graphique :

Nous avons report\u00e9 le cholest\u00e9rogramme au-dessous du lipidogramme en abscisse figure d'une part la largeur de chaque bandelette, d'autre part l'emplacement des diff\u00e9rentes cat\u00e9gories de prot\u00e9ines, et en ordonn\u00e9e la valeur du cholest\u00e9rol exprim\u00e9e en gramme par l. et la d\u00e9flexion en cm (fig. 3).

B . JUSTIFICATION DE LA METHODE

Deux probl\u00e8mes se posent tout d'abord .

- reproductibilit\u00e9 de la m\u00e9thode
- sensibilit\u00e9 de la m\u00e9thode

Nous envisagerons ensuite la stabilit\u00e9 de la coloration . La constance de la m\u00e9thode et finalement l'extraction et la conservation du s\u00e9rum .

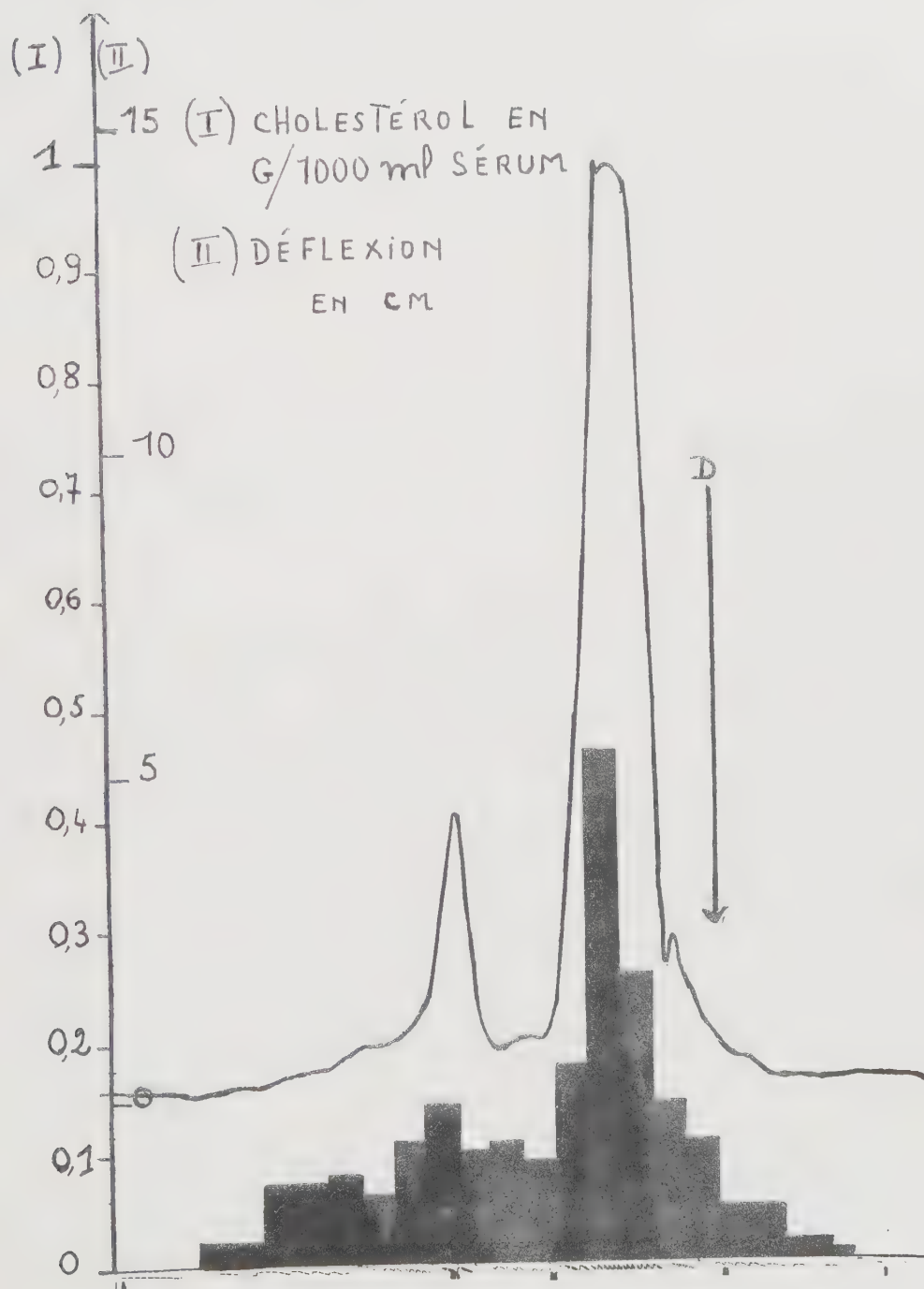
1 . Reproductibilit\u00e9 de la m\u00e9thode

FURST et LANGE pensent que de petites variations de la viscosit\u00e9 de l'acide sulfurique ou une diff\u00e9rence de temp\u00e9rature lors du m\u00e9lange des r\u00e9actifs, peuvent donner des r\u00e9sultats discordants . Il \u00e9tait donc n\u00e9cessaire de v\u00e9rifier les r\u00e9sultats obtenus \u00e0 partir de quantit\u00e9s connues de cholest\u00e9rol .

a) Nous avons \u00e9tabli une gamme \u00e9talon \u00e0 partir de la solution m\u00e8re .

Dans un ballon jaug\u00e9 de 25 ml, nous avons d\u00e9pos\u00e9 2 ml de la solution m\u00e8re et compl\u00e9t\u00e9 avec le r\u00e9actif au perchlorure de fer , nous avons donc une solution contenant 0,08 mg ou 80 μ g de cholest\u00e9rol par ml .

Lipidogramme et cholestérogramme d'un sérum
Humain normal.



A partir de cette solution, nous préparons en 3 exemplaires 2 séries de tubes contenant respectivement . 2-4-6-8-10 μg pour l'une, 16-24-32-40-48-56-64-72-80 μg de cholestérol pour l'autre, chaque tube est complété à 1 ml avec le réactif ou perchlorure de fer. Le dosage est effectué selon la technique décrite : nous prélevons 0,8 ml de l'éluant auquel nous ajoutons 0,48 ml de SO_4H_2 pur concentré . Donc les quantités de cholestérol servant effectivement à la gamme sont les 8/10 de celles données plus haut (1,6 μg à 64 μg) .

Résultats :

Les résultats sont consignés dans les tableaux de la page suivante . Dans le premier nous donnons les densités optiques obtenues pour des valeurs de cholestérol comprises entre 6,4 μg et 64 μg et dans le second les densités optiques correspondant à des teneurs en cholestérol variant de 1,6 à 8 μg .

Nous constatons que les densités optiques des différentes séries sont très voisines . On peut donc affirmer que cette méthode est reproductible . L'écueil signalé par FURST et LANGE (1954) concernant les variations de température, peut être évité . Lorsqu'on ajoute l'acide sulfurique, il se produit immédiatement une augmentation de température (+ 52°) . Cette augmentation de température est fonction de la quantité de H_2SO_4 de la vitesse avec laquelle il est ajouté et elle dépend également de la promptitude avec laquelle on homogénéise le mélange . Pour que le développement de la réaction soit complet, il est indispensable de mélanger brusquement les deux réactifs acide sulfurique et acide acétique contenant le perchlorure de fer .
(PIERFITTE 1959)

FURST et LANGE objectent également à cette méthode que des variations de viscosité de l'acide sulfurique peuvent être source d'erreurs .

Nous avons pratiqué des dosages pendant plusieurs mois, en employant toujours de l'acide sulfurique Merck provenant de lots différents :

TABLEAU 4

Relation entre la quantité de cholestérol et la densité optique de la solution colorée (3 séries) .

		Cholestérol (en µg par essai)										
		64	57.6	51.2	44.8	38.4	32.0	25.6	19.2	12.8	6.4	0
D. O.	Série n° 1	1.150	1.020	.900	.785	.685	.580	.450	.340	.205	.110	0
	Série n° 2	1.100	1.010	.920	.785	.670	.570	.455	.350	.215	.115	0
	Série n° 3	1.120	1.005	.915	.800	.675	.570	.460	.350	.220	.105	0
Moyenne		1.123	1.011	.911	.790	.676	.573	.455	.345	.213	.110	0
d. s.		0,025	0,008	0,011	0,086	0,008	0,005	0,005	0,006	0,007	0,005	
d. s. %		2.2	0.8	1.3	1.1	1.2	1.0	1.1	1.7	3.6	4.6	0

Le taux du cholestérol varie entre 64 et 6.4 µg .

TABLEAU 5

Relation entre la quantité de cholestérol (entre 8 et 1.6 µg) et la densité optique de la solution colorée .

		Cholestérol (en µg par essai)				
		8	6.4	4.8	3.2	1.6
D. O.	Série n° 1	.145	.110	.087	.068	.040
	Série n° 2	.140	.110	.080	.073	.038
	Série n° 3	.150	.115	.093	.075	.045
Moyenne		.145	.112	.086	.072	.041
d. s.		0.005	0.002	0.006	0.003	0.003
d. s. %		3.45	2.4	7.5	5	8.8

or tous les dosages s'accompagnent de la mesure d'un tube étalon contenant 32 μg de cholestérol, la densité optique de cet étalon a toujours été égale à $0,570 \pm 0,010$. Il semble donc que cette objection puisse être écartée en utilisant de l'acide sulfurique pur provenant toujours du même fabricant.

b) Comme cette recherche a pour objet l'extraction du cholestérol à partir d'une bande d'électrophorèse, nous avons également préparé une gamme étalon à partir de quantités connues de cholestérol déposées sur bande afin de vérifier que le tampon ou le papier ne jouaient aucun rôle dans l'extraction ou dans la réaction colorée.

Nous avons imprégné des bandes de tampon T.E.B., elles ont été séchées à l'étuve à 120° et découpées en morceaux de 5 mm de largeur. Nous avons ensuite déposé des quantités connues de cholestérol à partir de la solution étalon dont la teneur en cholestérol est de 40 μg par ml. Nous avons ainsi obtenu, des papiers sur lesquels il y avait 40-32-24-16-8 μg de cholestérol comme le dosage a été réalisé sur 0,80 ml nous donnons dans le tableau suivant les 8/10 des quantités citées plus haut.

Résultats :

TABLEAU 6

Relation entre les quantité de cholestérol déposées sur papier filtre et les densités optiques.

Quantité de cholest. en μg	6,4	12,8	19,2	25,6	32
1er dosage	0,115	0,210	0,345	0,450	0,565
2e dosage	0,125	0,200	0,360	0,455	0,560
Moyenne	0,120	0,205	0,352	0,452	0,562

Ces résultats concordent entre eux, et avec ceux donnés dans le tableau 4 .

On peut affirmer, après cette expérience que ni le tampon, ni le papier n'interviennent dans le dosage du cholestérol .

2 . Sensibilité de la méthode

En reportant sur un graphique la moyenne des résultats donnés dans les tableaux 4 et 5, l'ordonnée représentant les densités optiques, et l'abscisse la quantité de cholestérol, nous obtenons une relation linéaire (figure 4) . La linéarité est très satisfaisante pour des quantités de cholestérol allant jusqu'à 4,8 µg, pour des doses plus faibles la linéarité est moins bonne (il suffira alors de prendre des solutions étalon voisines de celles recherchées) .

3 . Stabilité de la coloration

Tous les auteurs (CRAWFORD 1958-ASSOUS 1962), CLAUDE (1963) FERRAND 1959) s'accordent à reconnaître, comme un des avantages de la méthode de ZAK, la grande stabilité de sa coloration. FERRAND pense que la coloration est stable plusieurs heures si l'on conserve les tubes à la glacière et à l'obscurité . ASSOUS donne dans un tableau, le laps de temps où la coloration est stable en fonction de la température . Nous n'avons pas étudié systématiquement cette question, car les lectures ont été faites après une demi-heure de séjour à l'obscurité et le temps de lecture n'excède pas 10 minutes, mais simplement noté des différences infimes en faisant une deuxième lecture après conservation des tubes pendant deux heures à l'obscurité .

4 . Constance de la méthode

Dans le chapitre sur l'électrophorèse, nous avons signalé que nous préparions deux bandes pour le dosage du cholestérol, pratiquement tous les dosages ont été faits en double . Il est intéressant de comparer les chiffres

obtenus lors de deux mesures d'un même sérum . Les chiffres que nous donnons sont les densités optiques . Il n'est pas nécessaire de convertir ces chiffres en grammes de cholestérol pour montrer la constance des résultats .

TABEAU 7

	D.O. proportionnelle à la teneur en cholestérol				bande n°	D.O. proportionnelle à la teneur en cholestérol			
	Sérum n° 1		Sérum n° 2			Sérum n° 1		Sérum n° 2	
	1er dos	2e dos	1er dos	2e dos		1er dos	2e dos	1er dos	2e dos
1	.075	.080	.060	.060	11	.030	.035	.045	.058
2	.330	.330	.325	.340	12	.040	.030	.060	.060
3	.390	.380	.700	.700	13	.045	.050	.030	.020
4	.140	.130	.510	.530	14	.040	.030	.060	.050
5	.025	.030	.200	.210	15	.020	.015	.060	.060
6	.010	.010	.050	.050	16	.020	.020	.015	.010
7	.060	.050	.075	.065	17	.060	.055	.005	.0
8	.070	.065	.095	.090	18	.030	.030	.050	.050
9	.030	.040	.035	.040	19	.020	.015	.040	.045
10	.020	.030	.040	.040	20	.010	.010	.020	.015

Après avoir vérifié la sensibilité, la reproductibilité, la constance de la méthode, nous aborderons maintenant l'étude de l'extraction du cholestérol

5 . Extraction du cholestérol

a) Référence de la méthode

Notre point de référence a toujours été le dosage du cholestérol sur le sérum total effectué selon la méthode décrite par HENLY 1957 et citée plus haut . Il n'a pas paru utile de comparer cette méthode avec celle de SCHOENHEIMER et SPERRY (1934) modifiée par SPERRY et WEBB (1950) et qui est souvent citée comme référence . Cette comparaison a été faite par d'autres auteurs, nous

donnons les résultats de LANGAN, DURRUM et JENCKS (1955) dans le tableau ci-dessous .

TABLEAU 8

Comparaison des résultats obtenus par la méthode de SCHOENHEIMER et SPERRY sur le sérum total et par la méthode au perchlorure de fer dans les fractions α et β cholestérol après élution (d'après LANGAN).

SERUM	Cholestérol du sérum déterminé par la méthode de Schoenheimer et Sperry	Cholestérol élué et déterminé par la méthode au perchlorure de fer	Rendement
1589	202	192	95
1590	231	226	99
1592	238	258	110
1593	332	337	102
1595	328	330	101
Pool de SERUMS	288	261	91
Rendement moyen			100

Nous avons considéré que la méthode d'extraction et le dosage proposés dans ce travail étaient satisfaisants car les résultats obtenus étaient sensiblement les mêmes que ceux fournis par un dosage direct sur le sérum total . Dans le tableau suivant nous comparons des dosages de cholestérol réalisés sur le sérum total et sur les bandes d'électrophorèse .

TABLEAU 9

Comparaison du cholestérol total avec l'ensemble des cholestérols individuels mesurés sur des électrophérogrammes (40 expériences) .

sérum n°	Cholestérol en g %		sérum n°	Cholestérol en g %	
	Segments de 0,5 cm	Total du sérum		Segments de 0,5 cm	Total du sérum
1	1.86	1.92	21	2.65	2.88
2	1.97	1.92	22	2.93	3.00
3	1.99	2.00	23	2.92	3.00
4	2.10	2.01	24	3.21	3.16
5	2.20	2.08	25	3.28	3.24
6	2.06	2.10	26	3.33	3.24
7	2.07	2.13	27	4.10	3.29
8	2.15	2.13	28	3.44	3.36
9	2.06	2.13	29	3.60	3.43
10	2.32	2.20	30	3.60	3.43
11	2.49	2.20	31	3.21	3.56
12	2.36	2.38	32	3.72	3.68
13	2.44	2.39	33	3.72	3.68
14	2.59	2.40	34	3.89	3.78
15	2.43	2.44	35	3.90	3.84
16	2.68	2.52	36	3.83	3.92
17	2.53	2.56	37	4.10	3.95
18	2.68	2.72	38	4.10	4.20
19	2.63	2.75	39	4.14	4.25
20	2.72	2.80	40	4.20	4.38

Si nous excluons le sérum 27 où la différence est très importante et peut être imputable à une erreur de manipulation, lorsque nous calculons la moyenne des écarts nous arrivons à une différence de $\pm 0,098$ g par dosage de qui donne, par rapport au cholestérol dosé dans le sérum total, une erreur de 3 % .

Nous pouvons conclure que pour des doses allant de 1 à 4 grammes, nous extrayons la totalité du cholestérol sur les bandes d'électrophorèse, ceci est valable pour un cholestérol réparti sur toute la bande .

b) Capacité d'extraction de l'éluant

Un autre problème alors se pose, dans le cas de sérums pathologiques très riches en cholestérol, ou dans le cas d'injection à des animaux, d'hypercholestérolémiant, la majorité du cholestérol se trouve dans les β lipoprotéines et souvent dans une zone étroite. C'est-à-dire que dans cette partie là, le rapport cholestérol-éluant est élevé il faut donc savoir quelle est la capacité d'élution du réactif au perchlorure de fer.

Dans le but de déterminer cette capacité d'élution, nous avons expérimenté de la façon suivante.

Première expérience.

Sur des bandes d'électrophorèse, imprégnées de T.E.B. nous disposons le long d'un trait de crayon 40 μ l de sérum dont la teneur en cholestérol est connue, nous séchons immédiatement le dépôt sous courant d'air chaud de façon à éviter le plus possible la diffusion. Les dépôts sont fixés par passage à l'étuve à 120° puis ils sont découpés, nous obtenons ainsi des bandelettes d'environ 1 cm de largeur. Chaque bande est éluee avec 1 ml du réactif au perchlorure de fer pendant 1 heure.

Nous reprenons 0,8 ml de l'éluat, nous ajoutons l'acide sulfurique et nous laissons la coloration se développer à l'obscurité.

L'expérience porte sur 3 sérums et chaque sérum a été dosé 5 fois.

TABLEAU 10

SERUM n°	Volume déposé	Cholestérol g % sur sérum total	Cholestérol en g % extrait	Rendement %
1	40 μ l	2,60	1,41	54
2	40 μ l	3,84	2,20	57
3	40 μ l	3,24	1,71	52

Ce tableau montre que 1 ml d'éluant n'est pas suffisant pour extraire le cholestérol contenu dans 40 μ l de sérum, nous avons un rendement compris entre 50 et 60 % quelle que soit la teneur initiale en cholestérol .

Deuxième expérience .

Nous avons repris cette expérience en diluant le sérum au demi avec de l'eau physiologique et dans les mêmes conditions que précédemment, nous faisons des dépôts correspondant à 10 μ l et à 20 μ l de sérum .

Voici les résultats .

Résultats :

TABLEAU 11

SERUM n°	Volume déposé	Cholestérol g % sur sérum total	Cholestérol en g % extrait	Rende- ment %
1	10 μ l	2.60	2.61	100
	20 μ l		2.50	95
2	10 μ l	3.84	3.93	102
	20 μ l		3.72	96
3	10 μ l	3.24	3.17	97
	20 μ l		3.16	97
4	20 μ l	4.36	4.20	96,3

Ces expériences montrent que pour avoir un rendement satisfaisant, il faut que 1 ml d'éluant ait au plus à extraire le cholestérol contenu dans 20 μ l de sérum . Ces résultats sont corroborés par le tableau suivant .

TABLEAU 12

Extraction de bandes de 5 mm comportant 20 μ l de sérum .
Rendement de l'extraction pour 10 sérums différents (chaque chiffre est la moyenne de 5 dosages) .

Sérum	Cholestérol (en g %,)		Rendement %
	total	extraît	
Lev..	3.68	3.54	96
Cou..	3.44	3.56	103
We..	4.20	4.04	96
Esp..	2.68	2.50	93
Du..	2.20	2.22	100
Meu..	3.56	3.50	100
Jea..	3.92	3.60	91
Mart..	3.12	3.00	96
Parg..	2.20	2.22	100
Av..	2.28	2.28	100

Nous avons repris l'expérience précédente, c'est-à-dire que nous faisons des dépôts correspondant à 20 μ l de sérum . L'expérience porte sur 10 sérums différents dont les taux de cholestérol s'étalent entre 2,28 g et 4,20g et le rendement moyen est de 97,5 % avec de faibles écarts, alors que les valeurs initiales du cholestérol sont très différentes .

Cette difficulté d'extraction du cholestérol contenue dans 40 μ l de sérum par 1 ml du réactif éluant est-elle due :

- à une saturation du milieu en cholestérol ?

- à un vernis superficiel formé par les protéines ?
- à une saturation en lipoprotéines ?

Nous étudierons successivement ces différentes hypothèses .

α) Saturation en cholestérol

Si c'était le cas, 1 ml d'éluant extrairait, au maximum, une certaine quantité de cholestérol, limite qu'il ne pourrait pas dépasser, or lorsque nous déposons 40 µl de sérum, le rendement est compris entre 50 et 60 % quel que soit le taux initial de cholestérol (notre expérience porte sur des taux allant de 2,60 g à 3,84 g) .

De même lorsque nous déposons des quantités correspondant à 20 µl de sérum, le rendement est de 97 % quel que soit le taux du cholestérol (nous avons des teneurs en cholestérol variant de 2,28 g à 4,36 g) . Donc la saturation de l'éluant en cholestérol ne paraît pas être mise en cause .

β) Formation d'un vernis dû aux protéines

Une telle cause paraît possible, puisque l'extraction est pratiquement complète lorsque le sérum est dilué, pour vérifier cette hypothèse, nous faisons l'expérience suivante :

Expérience :

Sur des bandes d'électrophorèse imprégnées de tampon T.E.B. nous disposons une solution chloroformique de cholestérol (solution à 160 µg par ml) . Les dépôts représentent 10, 20, 40 µg de cholestérol, ils ont été découpés, immergés dans une solution de sérum-albumine à 80 g pour 1 000 dans l'eau physiologique, et séchés . Simultanément, nous préparons un témoin . C'est-à-dire des dépôts de cholestérol sans sérum-albumine .

TABLEAU 13

Chaque chiffre est la moyenne de 3 dosages)

Quantité de cholest. déposée	Témoins	Cholestérol + sérum albumine	Rendement
40 µg	40 µg	39,5 µg	98,7 %
20 µg	20 µg	20,5 µg	100 %
10 µg	10 µg	9,3 µg	93 %

Les différences notées sont extrêmement faibles, et elles ne permettent pas de dire que la sérum-albumine est un obstacle à l'extraction du cholestérol libre, or, la sérum-albumine représente la partie protéinique la plus importante, en conséquence, il semble logique de penser que l'extraction incomplète du cholestérol contenu dans 40 µl de sérum par 1 ml d'éluant n'est pas imputable à un vernis formé par les protéines.

8) Extraction incomplète due au complexe formé par les lipoprotéines

Pour affirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons tout d'abord été amené à préparer une solution de lipoprotéines selon la méthode préconisée par BURSTEIN (1957).

Nous additionnons à 10 ml de solution de Cl_2Ca (0,025 M) 1 ml de sérum, puis nous ajoutons 0,20 ml d'une solution d'héparine à 1 %. Immédiatement, il se forme un précipité de β lipoprotéines, nous centrifugeons pendant 10 minute à 5 000 tours, le précipité adhère au fond du tube, tout le liquide surnageant est enlevé et nous redissolvons le précipité dans 1 ml d'eau physiologique. Nous avons ainsi le complexe β lipoprotéinique débarrassé des autres constituants du sérum. A partir de cette solution de β lipoprotéines, nous faisons des dépôts de 10, 20, 30, 40, 50 µl, ceux-ci sont traités comme précédemment.

Résultats :

Nous avons pratiqué auparavant un dosage de cholestérol sur la solution de β lipoprotéines. Elle contient 1,47 g de cholestérol.

Les résultats obtenus à partir des dépôts sont consignés dans le tableau suivant .

TABLEAU 14

Volume de β lipoprotéines en μ l	10	20	30	40	50
Quantité cholest. extrait g pour 1 000	1,45	1,16	1,02	0,91	0,74
Rendement %	100	80	70	61	50

Nous constatons que plus la quantité de lipoprotéines augmente moins nous extrayons de cholestérol . Il semblerait donc bien que c'est la teneur en β lipoprotéines qui serait responsable du mauvais rendement à partir de 40 μ l de sérum .

Pour vérifier cette assertion , il faudrait doser le cholestérol avant et après destruction du complexe lipoprotéinique . Nous avons fait appel à différents produits qui étaient susceptibles de rompre ce complexe : vapeurs de HCl, de NH_3 de formol, nous nous sommes servi également de certains saponosides stéroliques (POLONOVSKI 1957). Nous n'avons pas obtenu de bons résultats .

Conclusion :

Les résultats donnés plus haut montrent que l'extraction du cholestérol n'est totale que pour des quantités correspondant à 20 μ l de sérum . Cela ne réduit pas la valeur de la méthode, en effet nous avons d'une part le critère d'additivité (la somme du cholestérol des 20 bandelettes est égale au cholestérol total). D'autre part, le calcul montre que dans 5 mm de la bande d'électrophorèse, nous avons au maximum 11 % des protéines totales, 30 % du cholestérol total, 49 % des lipides totaux . On se trouve en conséquence dans la zone d'extraction totale quelle que soit la richesse en lipides ou en cholestérol de chaque segment de papier .

Une dernière question reste à résoudre : la conservation du cholestérol .

5 . Conservation du cholestérol

On étudiera dans ce chapitre successivement plusieurs problèmes .

a) Conservation du cholestérol dans le sérum total

Le sérum étant conservé à température ordinaire
à la glacière
à - 20°

b) Conservation du cholestérol sur les bandes d'électrophorèse

c) Etude des variations du lipidogrammes et du cholestérogramme en fonction de la conservation du sérum .

a) Conservation du cholestérol dans le sérum total

On sait que la conservation du sérum entraîne des modifications de ses composants. Cependant ANDERSON et KEYS 1956 prétendent que si pour un dosage de cholestérol on ne peut pas garder le sérum plus de 1 ou 2 jours à la glacière, par contre le taux de cholestérol ne varie pas lorsqu'il s'agit de sérum conservé à - 20° .

Comme le problème présentait une certaine importance , nous avons fait trois séries d'expériences ayant pour but de faire connaître si le sérum pouvait être stocké, dans quelles limites et dans quelles conditions .

α) Sérum conservé à température ordinaire

Nous avons prélevé du sang chez trois sujets normaux . Il a été centrifugé et le sérum a été prélevé après 5 heures , un dosage a été immédiatement réalisé et il a été renouvelé 24, 48, 72 et 96 heures après . Le sérum étant conservé à température ordinaire .

Résultats :

TABLEAU 15

SÉRUM. n°	CHOLESTEROL en g pour 1 000 ml				
	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	2,42	2,40	2,41	2,38	2,37
2	1,92	1,95	1,96	1,95	1,90
3	1,85	1,85	1,83	1,84	1,86

En ce qui concerne le dosage du cholestérol total dans le sérum après 96 h. de conservation à température ordinaire il n'y a pas de variations significatives .

β) Sérum conservé à 4°

Une partie des sérums utilisés dans l'expérience précédente a été conservée à la glacière à + 4° . Nous avons également fait des dosages après 24 , 48 , 72 et 96 heures .

Résultats

TABLEAU 16

SÉRUM n°	CHOLESTEROL en g pour 1 000 ml				
	5 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	2,42	2,44	2,44	2,39	2,39
2	1,92	1,94	1,96	1,95	1,92
3	1,85	1,87	1,86	1,83	1,85

Ces résultats sont ceux que l'on pouvait attendre . N'ayant pas eu de diminution du cholestérol total lors de la conservation à température ordinaire , à fortiori

on pouvait imaginer que la teneur en cholestérol ne s'abaisserait pas dans les sérums conservés à + 4°

8) Sérum conservé à - 20°

Comme pour les expériences précédentes le prélèvement a porté sur 3 sujets normaux . Il a été fait un dosage 0 heures après (taux initial), puis le sérum a été mis en freezer à - 20° et nous avons procédé à des dosages 3 jours , 5 jours , 7 jours , 9 jours après .

Résultats

TABLEAU 17

SÉRUM n°	CHOLESTEROL en g pour 1 000 ml				
	Taux initial	3 jours	5 jours	7 jours	9 jours
1	2,60	2,63	2,42	2,60	2,58
2	1,88	1,92	1,94	1,85	1,88
3	2,01	2,03	1,99	2,08	2,03

Nous n'avons pas poursuivi plus avant ces expériences car dans le cadre de notre travail elles étaient suffisantes , les électrophorèses et les dosages étant pratiqués le plus tôt possible après la prise de sang, nous n'avons pas eu à conserver des sérums au freezer au delà de ces délais .

En conclusion lorsqu'il s'agit d'exécuter un dosage de cholestérol total sur le sérum , on peut le faire sur du sérum conservé à température ordinaire ou à la glacière (pour des temps relativement courts) ou au freezer (pour des durée plus longues)

b) Conservation du cholestérol sur les bandes d'électrophorèse

Notre travail, portant sur le dosage du cholestérol sur des bandes d'électrophorèse, il était primordial de savoir si ce dosage devait suivre immédiatement l'électrophorèse ou si nous avions la possibilité de stocker les bandes quelques jours. Les indications que nous possédions dans ce domaine étaient contradictoires.

LANGAN et DURRUM (1955) affirment qu'après quatre jours la concentration en cholestérol a diminué de 55 % lorsqu'on conserve les bandes à l'air libre et de 16 % lorsqu'elles sont conservées sous atmosphère d'Azote. Ces auteurs attribuent cette diminution à une oxydation du cholestérol (BERGSTRÖM 1941).

ANDERSON et KEYS 1956 prétendent au contraire que le cholestérol sur bande peut se conserver plusieurs semaines.

Pour trancher ce problème nous avons effectué deux séries d'expériences.

α) Expérience sur la conservation de dépôts de sérum sur papier non soumis à l'électrophorèse

Des dépôts de 20 µl sont faits sur des bandes imprégnées de T.E.B. et séchées. L'expérience porte sur quatre sérums dont les taux de cholestérol sont connus et des dosages, à partir des dépôts, sont réalisés immédiatement, puis 1. 2. 4. 7. 11. 14 et 16 jours après.

Les résultats donnés dans le tableau 18 sont la moyenne de 5 dosages.

TABLEAU 18

SERUM n°	Cholest. du sérum total gr %.	CHOLESTEROL en g %.						
		1°j	2°j	3°j	4°j	5°j	6°j	7°j
1	3.46	3.46	3.38	3.46	3.26	2.76	2.26	2.25
2	2.94	2.94	2.96	2.86	2.80	2.76	2.44	2.14
3	2.28	2.28	2.28	2.28	2.18	1.82	1.75	1.34
4	2.24	2.24	2.30	2.34	2.34	2.22	2.04	1.60

Si nous exprimons ces résultats en pourcentage de cholestérol extrait par rapport au cholestérol total nous aurons le tableau suivant .

TABLEAU 19

SERUM n°	Cholest. total en g %.	Cholestérol sur bandes en pourcentage du taux initial						
		1°j	2°j	4°j	7°j	11°j	14°j	16°j
1	3.46	100	97,6	100	94,2	79,7	65	65
2	2.94	100	100,6	97,2	95,2	93,8	82,9	72,7
3	2.28	100	100	100	95,6	79,8	85,8	58,7
4	2.24	100	102	104	104	99,1	99,1	71,42

Les résultats sont quelque peu divergents puisque pour une sérum, au 11^{ème} jour nous retrouvons encore 99 % du cholestérol, alors que pour un autre nous n'avons que 79 % après ce même laps de temps . Nous pouvons affirmer que pendant les quatre jours qui suivent le dépôt, les bandes étant conservées à température ordinaire sans précaution spéciale ,il n'y a pas de perte appréciable de cholestérol .

β) Conservation du cholestérol après électrophorèse

Il s'agit de la même expérience que précédemment . Mais au lieu de simples dépôts, le sérum migre selon les conditions opératoires décrites . Avec le même sérum frais, nous effectuons 16 bandes d'électrophorèse . Le cholestérogramme a été fait immédiatement après le séchage des bandes puis 2, 4, 7, 9, et 14 jours après, chaque dosage est fait simultanément sur 2 bandes .

TABLEAU 20

Cholestérol en g %, et pourcentage						
Taux initial	1° j	2° j	4° j	7° j	9° j	14° j
2.37	2.37	2.30	2.40	2.26	1.96	1.76
100	100%	97%	101%	95%	82.7%	70.3%

Ces résultats corroborent ceux donnés pour les dépôts .

Donc en pratique, nous pouvons faire des dosages sur des bandes conservées 4 jours sans condition spéciale .

c) Etude des variations du lipidogramme et du cholestérogramme en fonction de la conservation du sérum

La migration des protéines en fonction du temps a été bien étudiée . On sait (ARDRY 1956) qu'au cours de la conservation du sérum il se produit un resserrement progressif de l'électrophérogramme, tout d'abord la mobilité des globulines est accélérée, elles se rapprochent de la sérum-albumine, puis on note une diminution de la vitesse de migration de toutes les fractions . Il est donc vraisemblable que la migration du complexe lipoprotéinique subit également des variations . De plus, on connaît la fragilité de ces lipoprotéines (WUNDERLY 1956) cependant CRAWFORD (1958) donne des valeurs du cholestérol lié aux α et β lipoprotéines après migration du sérum conservé de 1 à 24 semaines au freezer . Il ne note pas de différence appréciable ni dans la

teneur en cholestérol, ni dans l'index de migration .

Nous reproduisons ici un tableau donné par cet auteur .

TABLEAU 21

Effet de la conservation du sérum à - 20° sur la teneur en
cholestérol des α et β lipoprotéines

durée de la conservation en semaine	Cholest. total mg %	teneur en cholest. des lipoprotéines mg %		index migration
		α	β	
Frais	290	24	76	0.46
1	283	25	75	0.43
2	286	24	76	0.44
3	287	28	72	0.44
6	281	29	71	0.49
8	281	25	75	0.51
12	279	26	74	0.45
24	288	24	76	0.46

Pour notre part, nous avons observé au cours de la conservation du sérum que ce soit à la glacière ou au freezer des variations topographiques du lipidogramme. Notamment, il apparaît une traînée de chylomicrons entre le dépôt et les β lipoprotéines qui n'existe pas lorsqu'on opère sur du sérum frais . Le cholestérogramme également varie, il garde la même allure générale mais il n'est pas superposable à un cholestérogramme fait sur du sérum frais . Nous donnons deux graphiques représentant le lipidogramme et le cholestérogramme du même sérum l'un fait sur du sérum frais, l'autre sur du sérum conservé 4 jours au freezer .

En résumé, comme nous n'avons pas des lipidogrammes et des cholestérogrammes superposables pour ne pas avoir à utiliser des facteurs de correction qui auraient été difficiles à établir, toute l'expérimentation sur l'homme et sur l'animal a été faite dans les mêmes conditions, c'est-à-dire que les électrophorèses sont réalisées sur du sérum prélevé au maximum depuis 5 heures, en opérant toujours dans ces conditions les résultats sont comparables .

(I) (II) (I) CHOLESTEROL EN
G / 1000 ml SERUM

(II) DEFLEXION
EN CM

SERUM FRAIS

SERUM CONSERVÉ
4 jours au freezer

143

40 150

ALB

α_1 α_2

β

β_1

β_2

γ

ALB

α

β

γ

figure 5 : Etude de la conservation du lipidogramme et du cholestérogramme

CONCLUSION .

Dans cette première partie nous décrivons une méthode de dosage du cholestérol permettant l'étude de sa répartition sur les bandes d'électrophorèse . Nous avons analysé les modalités de l'électrophorèse et du dosage qui suit cette séparation électrophorétique .

2^{ème} PARTIE

FRAC TIONS LIPOPROTEINIQUES ET CHOLESTEROLIQUES
DANS LE SERUM DU SUJET NORMAL

INTRODUCTION

Cette seconde partie sera consacrée à l'application de la méthode précédemment décrite à l'étude de sujets apparemment en bonne santé . Nous comparerons les résultats obtenus avec ceux mentionnés par d'autres auteurs et déterminés par des techniques différentes

Avant d'étudier la répartition électrophorétique du cholestérol, il nous a semblé utile de faire un rappel des travaux réalisés jusqu'à nos jours sur les lipoprotéines . Nous serons amenée en effet à envisager dans cette partie et surtout dans la 3ème partie les variations des lipoprotéines . Or, ce ne sont pas des entités bien définies : elles représentent un mélange extrêmement complexe de protéines et de lipides . Ainsi leur étude et les résultats qui en découlent sont tributaires de la technique utilisée pour les fractionner .

Dans cette partie , nous envisagerons donc successivement :

Les techniques de fractionnement des lipoprotéines .

Les résultats obtenus en utilisant l'électrophorèse en tampon T.E.B.

Les histogrammes du cholestérol .

I . LES LIPOPROTEINES

A . GENERALITES SUR LES LIPOPROTEINES

Le sérum d'un sujet normal à jeun est limpide ; il contient, cependant, une quantité importante de lipides . Contradiction apparente car on sait (MACHEBOEUF 1928) que les lipides n'existent pas à l'état libre, mais combinés aux protéines, cette liaison protido-lipidique conditionne leur solubilité . Etant donnée, la complexité des 2 constituants des lipoprotéines, ces dernières sont caractérisées par leur hétérogénéité et le premier pas dans leur étude est la séparation en fractions qui, si elles ne sont pas absolument homogènes présentent, cependant, un certain nombre de points communs .

Donc la base de l'étude des lipoprotéines est leur fractionnement, (DE GENNES 1958) celui-ci repose sur trois principes fondamentaux :

- Le fractionnement chimique
- L'ultracentrifugation
- L'électrophorèse libre ou de zone

1 . FRACTIONNEMENT CHIMIQUE

La précipitation par les sels neutres (GARDNER 1928) a été complètement abandonnée car elle donnait des résultats extrêmement variables .

Le seul fractionnement chimique encore appliqué d'une façon courante est celui mis au point par COHN (1950) qui utilise l'éthanol à basse température (-5°) et fait également varier le pH et la concentration ionique des solutions .

Les lipoprotéines sont ainsi scindées en deux fractions principales .

FRACTION III contient la majorité des β lipoprotéines liées encore à des protéines (α globulines et β globulines) .

FRACTION IV renferme les α lipoprotéines également liées à des protéines .

RUSS et COLL. 1951 ont appliqué cette méthode de fractionnement à l'étude du sérum de sujets normaux et atteint d'athérosclérose .

On peut rattacher au fractionnement par des agents chimiques, des méthodes qui permettent la précipitation des β lipoprotéines .

- Précipitation des β lipoprotéines par l'héparine et les héparinoïdes de synthèse (BURSTEIN 1957) ou par le polyvinylpyrrolidone (BURSTEIN 1961) .

- Test de KUNKEL qui est une précipitation des β lipoprotéines par des phénols en milieu fortement chloruré, dans ce cas les lipoprotéines sont dénaturées.

- Précipitation des β lipoprotéines par voie immunologique (BURSTEIN 1956).

2. FRACTIONNEMENT PAR ULTRACENTRIFUGATION

Cette technique a été mise au point par JONES et GOFMAN et COLL. (1951) elle est fondée sur la différence de densité moléculaire qu'il existe entre les différentes fractions lipoprotéiniques du sérum . Par addition de chlorure de sodium, le poids spécifique du sérum est amené à 1,063, et il est ensuite soumis à un champ centrifuge intense .

Les lipoprotéines de poids spécifique supérieur à 1,063 sédimentent-elles sont appelées lipoprotéines de densité élevée ; tandis que les autres surnagent, ce sont les lipoprotéines de faible densité, elles sont toutes définies par un coefficient de flottation (Sf) .

Par des ultracentrifugations répétées les lipoprotéines de faible densité peuvent être subdivisées en un certain nombre de classes (Sf 0-12, Sf 12-20, Sf 20-400)

LINDGREN 1959 par cette méthode étudie les lipoprotéines dans des bandes encore plus étroites de flottation et essaie de déterminer leur structure .

3 . FRACTIONNEMENT ELECTROPHORETIQUE

Certainement le plus utilisé actuellement . Le principe en est simple : les protéines, molécules chargées électriquement, ont la possibilité de se déplacer dans un champ électrique .

L'électrophorèse libre (TISELIUS) est délaissée pour l'électrophorèse de zone . Les protéines et les lipoprotéines migrent sur un support solide qui peut-être l'amidon (KUNKEL 1952), la gélose (URIEL 1956) ou le papier (DURRUM 1952 - SWAHN 1953 - NIKKILA 1953) . Ce dernier procédé est très employé car il ne demande qu'un matériel peu coûteux, des quantités minimales de sérum et permet de faire des mesures en série .

Après migration les lipoprotéines sont révélées par le Noir Soudan (SWAHN 1953 - NIKKILA 1953), ou par l'Oil red-O (DURRUM 1952) .

Selon l'appareil employé - bandes posées à plat ou sur un chevalet- selon le tampon, le temps de migration, l'intensité appliquée aux bandes, les résultats diffèrent . Cependant dans tous les cas, on peut distinguer deux fractions principales :

Les β lipoprotéines dont l'emplacement peut varier . Tantôt, elles se situent au niveau des β_1 globulines et touchent les α_2 globulines, tantôt elles recouvrent les β_2 .

Les α lipoprotéines qui migrent au niveau des α_1 globulines et des albumines.

Certains auteurs (SWAHN - NIKKILA) distinguent une troisième fraction entre les β lipoprotéines et le dépôt .

Que ce soit par fractionnement chimique, par ultracentrifugation ou par électrophorèse, les lipoprotéines sont scindées en deux groupes principaux, et il y a une bonne corrélation entre ces différentes techniques (DE GENNES 1958 - ANDERSON 1956 - CRAWFORD 1959 - KUNKEL 1956) .

Le premier groupe appelé par convention les β lipoprotéines qui correspond à la fraction III₀ de COHN, aux lipoprotéines de faible densité de GOFMAN est le plus riche en lipides, il contient 60 à 70 % des lipides totaux du sérum .

Le second désigné sous le nom d' α lipoprotéines (Fraction IV de COHN ou lipoprotéines de densité élevée de GOFMAN) représente environ le tiers des lipides totaux .

HAVEZ (1962), après séparation électrophorétique du sérum donne comme pourcentage des différentes fractions : 23,5 % pour les α lipoprotéines et 76 % pour les β lipoprotéines .

B . RESULTATS PERSONNELS

I . CHOIX DES SUJETS ET PRELEVEMENT

Ces sujets sont apparemment en bonne santé . Il s'agit pour une part, de personnes se présentant au laboratoire pour des examens pré-nuptiaux, pour l'autre part de donneurs de sang du CENTRE de TRANSFUSION de NANCY .

On a ainsi 18 sujets qui représentent un échantillonnage varié puisqu'il comprend des hommes et des femmes de 20 à 50 ans .

Les prises de sang sont faites chez les sujets à jeun depuis la veille au soir . On laisse le sérum décanter à la température du laboratoire, on centrifuge et les électrophorèses sont faites 5 heures après le prélèvement, éliminant ainsi les aléas de la conservation dont nous avons déjà fait mention (diminution de la vitesse de migration des globulines, accolement avec les albumines (WUNDERLY 1956) .

Les électrophorèses sont réalisées selon le mode opératoire déjà décrit .
Dépôts de 40 μ l de sérum, migration de 19 heures en tampon T.E.B. . Puis après séchage des bandes coloration à l'Oil red-O ,

REPRESENTATION GRAPHIQUE DU LIPIDOGRAMME

Le lipidogramme se présente comme une bande rose pâle, avec, à partir du dépôt une première zone intensément colorée, très bien délimitée, qui sur l'enregistrement par l'appareil Analytrol se traduit par un clocher élevé généralement asymétrique . Puis nous trouvons séparé du premier par une zone étroite ne contenant pas de lipides, un second clocher, beaucoup moins important que le premier mais nettement individualisé et toujours présents chez les sujets normaux . Le deuxième pic est souvent suivi d'une zone où la coloration est faible mais non nulle . Cette partie correspond aux albumines du protéinogramme .

En tampon T.E.B. nous n'avons pas ce que SWAHN (1953) avait nommé la fraction III et qu'il situait entre le dépôt et le pic des β lipoprotéines .

Nous ne notons pratiquement jamais de coloration dans la zone correspondant aux γ globulines .

3 . RESULTATS NUMERIQUES

L'appareil Analytrol, en même temps qu'il traduit la bande du lipidogramme sous forme de courbe, enregistre un certain nombre d'unités qui sont fonction de la densité colorimétrique de la bande . Ces unités sont proportionnelles à la quantité de lipides totaux présents dans le sérum et elles permettent de calculer le pourcentage des α et β lipoprotéines .

Cette possibilité d'avoir un enregistrement quantitatif est importante , surtout dans le cas où nous comparerons le même sérum prélevé à différents moments (expérimentation sur l'animal) .

Les résultats obtenus chez des sujets normaux sont rassemblés dans le tableau de la page suivante .

Nous constatons que les α lipoprotéines ne représentent que 18 % des lipoprotéines totales tandis que les β lipoprotéines équivalent à 76 % . Cependant , il faut noter une très grande dispersion des résultats autour de cette moyenne .

Il faut dire que du fait de leur complexité, les lipoprotéines rendent mal compte du métabolisme lipidique d'où l'utilité d'étudier au lieu des lipoprotéines , un ou plusieurs de leurs constituants : nous avons choisi le cholestérol .

TABLEAU 22

LIPOPROTEINES CHEZ 18 SUJETS NORMAUX

(en unités densitométriques . Spinco)

SUJETS	LIPOPROTEINES TOTALES	LIPOPROTEINES α	LIPOPROTEINES β	RAPPORT α/β
1	135	27	90	3,33
2	239	18	198	11
3	214	33	165	5
4	215	35	168	4,8
5	123	35	67	1,9
6	191	64	116	1,81
7	145	22	96	4,36
8	215	43	251	5,84
9	187	22	151	6,9
10	238	22	196	8,4
11	205	23	144	6,28
12	177	51	95	1,9
13	160	52	82	1,6
14	350	39	294	7,5
15	260	40	197	4,9
16	145	32	103	3,2
17	203	40	150	3,75
18	160	12	142	1,8
M	198	34	150	4,91

II . CHOLESTEROL

A . GENERALITES

Le cholestérol joue un rôle indiscutable, mais non encore parfaitement défini dans l'athérosclérose . Son rôle est démontré par sa présence dans les lésions athéromateuses, par la possibilité de provoquer une athérosclérose expérimentale par ingestion de cholestérol chez le lapin et statistiquement par son augmentation dans les affections athéroscléreuses . Ces faits expliquent le nombre de recherches qu'il a suscitées.

Tout d'abord, il y a eu les nombreuses méthodes permettant le dosage du cholestérol total méthodes longues, nécessitant une extraction ou des quantités importantes de serum (GRIGAUT 1911) méthode plus simples (ZLATKIS 1953) et également des microméthodes (FIGUEROA 1960) .

Ce cholestérol total ne donne qu'une information très incomplète car le cholestérol n'existe pas libre mais combiné à d'autres corps et il entre dans la composition de ces substances particulièrement hétérogènes que sont les lipoprotéines.

Le fractionnement des lipoprotéines a permis une meilleure investigation de la répartition du cholestérol .

Ainsi BARR (1951) séparant les lipoprotéines par la méthode de COHN obtient quatre fractions dans lesquelles le cholestérol se répartit comme suit (Moyenne de 80 sujets normaux) .

- Cholestérol dans la fraction A correspondant aux lipoprotéines α 26,4 % du cholestérol total .
- Cholestérol dans la fraction B (γ globulines, traces albumine et β_2 globulines) = 2,4 % .

- Cholestérol dans la fraction C (β lipoprotéines) = 67,6 %
- Cholestérol dans la fraction D = 3,4 %

Pour cet auteur le cholestérol migrerait pour un tiers avec les α lipoprotéines les deux autres tiers étant contenus dans les β lipoprotéines .

BRADGON 1956, qui applique au fractionnement des lipoprotéines l'ultracentrifugation, sépare également quatre fractions dans lesquelles il a dosé le cholestérol les résultats sont donnés en pourcentage du cholestérol total :

- Chylomicrons = 9,15 %
- Lipoprotéines : D < 1,019 = 22,20 %
- Lipoprotéines : D: 1,019 - 1,063 = 48,8 %
- Lipoprotéines : D: 1,063 - 1,21 = 20,10 %

Dans ce cas le cholestérol des α et β lipoprotéines ne représente que les 3/4 du cholestérol total .

La méthode de fractionnement par la technique de BURSTEIN (1961) des α et β lipoprotéines permet aussi l'étude de la répartition du cholestérol dans ces deux fractions. Appliquant cette technique POLONOVSKI 1957 indique que 29 % du cholestérol sont contenus dans les α lipoprotéines et 71 % dans les β lipoprotéines.

L'étude de la répartition du cholestérol a surtout été faite après fractionnement électrophorétique . S'en référant au lipidogramme les différents auteurs portent exclusivement leur attention sur les fractions α et β lipoprotéiniques .

Ainsi NURY et SMITH (1957) après électrophorèse en véronal, et extraction du cholestérol par un mélange chloroforme - éthanol, en trouvent 20 % dans la zone des α lipoprotéines et 80 % dans celle des β .

CRAWFORD (1959) opérant dans des conditions semblables donne des chiffres un peu différents 27,6 % dans les α et 72,4 % dans les β lipoprotéines .

NIKKILA 1953 est allé plus loin dans l'étude de la répartition du cholestérol sur électrophérogramme , il distingue 4 fractions :

Albumine α_1	= 24,09 % du cholestérol total
α_2	= 10,65 %
β	= 64,22 %
γ	= 1,39 %

FASOLI (1953) subdivise la fraction β en β_1 et β_2 et il détermine les pourcentages de cholestérol suivants :

α_1	= 16,02 %
α_2	= 10,08 %
β_1	= 50,4 %
β_2	= 22,35 %
γ	= 1,06 %

Ainsi d'une notion peu significative de cholestérol total on arrive a des fractions de cholestérol qui reflètent mieux la réalité car, lorsqu'il y a augmentation du cholestérol total, cette augmentation ne se répartit pas uniformément sur toutes les fractions du cholestérol l'une ou l'autre peut être plus directement concernée .

B . RESULTATS PERSONNELS

En attendant d'avoir comme pour le lipidogramme une coloration directe sur bande qui permette l'enregistrement de courbes pour approcher la réalité nous sommes obligés de doser le cholestérol dans des fractions aussi petites que possible . Nous obtenons ainsi un histogramme qui permet déjà une très bonne étude de la répartition du cholestérol .

1 . Corrélation entre lipidogramme et histogramme du cholestérol .

Sur le même graphique nous avons représenté le lipidogramme et l'histogramme du cholestérol leur confrontation suggère plusieurs remarques :

Le lipidogramme se présente comme une courbe avec deux clochers inégaux .

L'histogramme présente en général 3 clochers : un dans la région des β lipoprotéines, un dans la région des lipoprotéines α , un dans la zone des albumines . Dans la région des γ globulines il n'y a pas de clocher bien qu'il y ait présence de cholestérol (le lipidogramme dans ces deux dernières zones ne présente pas de coloration) .

Il y a une certaine indépendance entre lipidogramme et histogramme du cholestérol, en effet le maximum du β cholestérol n'est pas toujours superposable au maximum des β lipoprotéines et ceci est encore plus net pour le cholestérol α et les α lipoprotéines .

2 . Corrélation entre protéinogramme et histogramme du cholestérol

Sur chaque graphique, on a porté en abscisse les différentes fractions du protéinogramme . Pour calculer le cholestérol, il nous a paru plus judicieux de nous référer au protéinogramme puisque le lipidogramme ne donne que deux indications α et β lipoprotéines, bien que l'on puisse tirer par déduction les autres fractions ; donc lorsqu'on parlera de cholestérol β ce sera celui correspondant à la fraction β du protéinogramme .

En fait il y a une bonne superposition entre les fractions du cholestérol rapportées au protéinogramme ou au lipidogramme comme l'indique le tableau suivant .

TABLEAU 23

Fractions du cholestérol sérique de 20 sujets normaux rapportées aux fractions principales du protéinogramme ou du lipidogramme (Moyenne) .

		Cholest. total g %.	Cholestérol %			
			β	α	Alb.	γ
Proti- do- gramme	g.	2,35	49,6	19,35	24,05	7,23
	d.s. + —	0,40	8,14	6,1	5,7	4,1
Lipi- do- gramme	g.	2,35	53,0	22,0	18	8,1
	d.s. + —	0,40	9,0	5,1	6,1	4,4

3 . Etude des différentes fractions

Avant d'étudier l'histogramme dans le détail considérons les principales fractions :

Pour un cholestérol total moyen de 2,32 g le cholestérol β est égal à 1,128 g c'est-à-dire qu'à lui seul, il représente 48,6 % du cholestérol total .

La richesse en cholestérol des β lipoprotéines à d'ailleurs été largement montrée.

Le cholestérol des α est égal à 0,458 g soit 19,7 % du cholestérol total, c'est un chiffre relativement faible par rapport à ceux cités par d'autres auteurs mais ces derniers incluent souvent dans cette fraction le cholestérol des albumines alors que nous avons pu nettement le séparer, et le cholestérol existant dans les albumines est en fait d'être négligeable en effet avec 0,580 g il représente 25 % du cholestérol total .

Enfin, la zone des globulines en contient 7 % .

En résumé, le cholestérol β est de loin le plus important, le cholestérol est à peu près également représenté dans les fractions correspondant aux albumines et aux α globulines

Cholestérol total et cholestérol des différentes fractions chez l'homme normal.

SUJETS N°	CHOLEST. TOTAL calculé	CHOLESTEROL β		CHOLEST. α	CHOLEST. Alb.	CHOLEST. γ
		Cholest. β total	Cholest. β max.			
1	2,20	1,03	0,534	0,37	0,44	0,36
2	3,01	1,50	0,625	0,57	0,72	0,23
3	2,64	1,29	0,59*	0,70	0,54	0,10
4	2,69	1,53	0,660	0,51	0,71	0,22
5	2,32	1,02	0,354	0,32	0,78	0,20
6	2,68	1,30	0,511	0,70	0,61	0,08
7	2,92	0,98	0,556	0,80	0,91	0,22
8	2,49	1,26	0,666	0,69	0,37	0,15
9	2,43	1,27	0,588	0,37	0,69	0,10
10	2,15	0,77	0,534	0,51	0,54	0,33
11	2,93	1,09	0,488	0,50	1,03	0,31
12	1,75	0,79	0,477	0,49	0,45	0,01
13	2	1,27	0,562	0,28	0,28	0,17
14	2,06	1,11	0,470	0,29	0,54	0,11
15	2,07	1,03	0,316	0,40	0,45	0,19
16	2,06	1,02	0,377	0,42	0,48	0,14
17	2,10	1	0,386	0,45	0,48	0,16
18	1,74	0,93	0,368	21	0,46	0,14
M	2,41	1,128	0,505	0,458	0,58	0,17
écart type	0,40	+ 0,208	+ 0,104	+ 0,204	+ 0,19	+ 0,09

et celui correspondant à la zone des γ globulines est très faible .

4 . Etude de l'histogramme

Le cholestérol β est le plus important . Ce cholestérol est représenté au minimum par cinq bandelettes, or fait assez curieux à constater une de ces bandelette se détache nettement des autres.

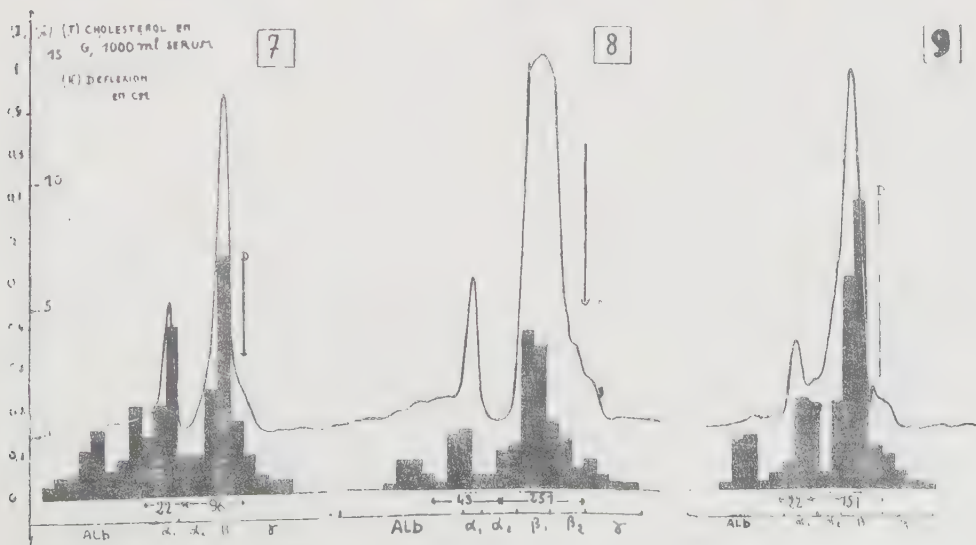
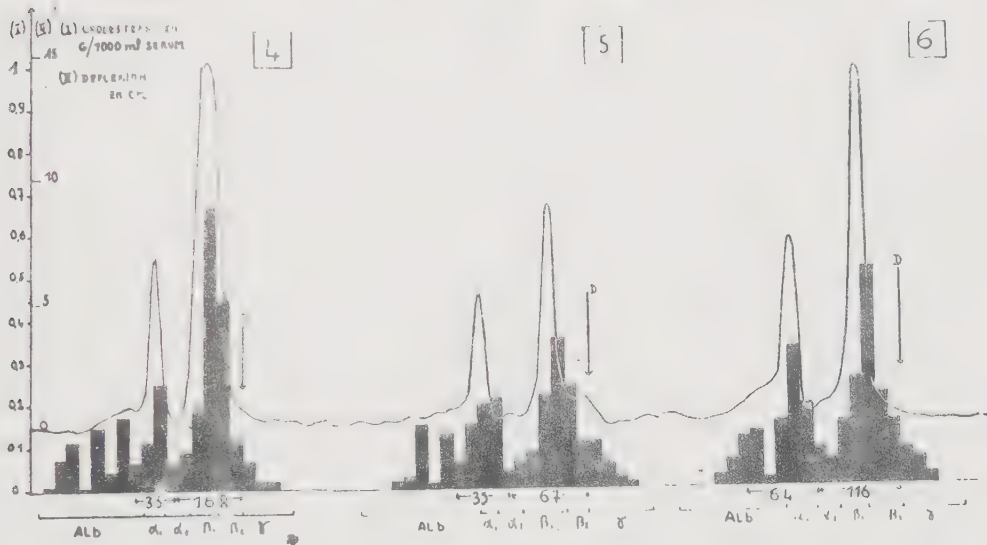
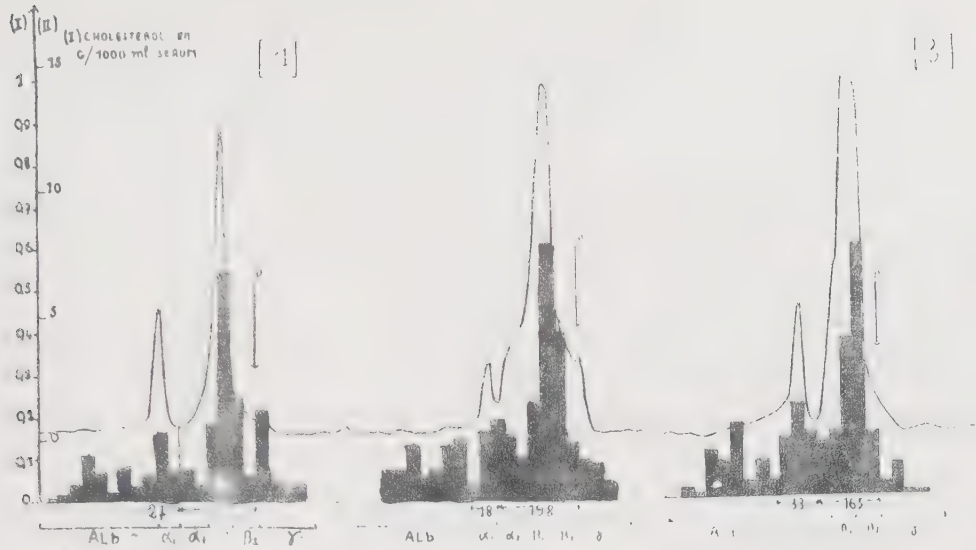
Nous avons un pic de cholestérol que nous appellerons cholestérol β maximum alors que le cholestérol β a une valeur moyenne de 1,128 g pour les 18 cas considérés le cholestérol β maximum est égal à 0,505 g soit 45% du cholestérol β total.

Ainsi ce cholestérol β maximum représente à lui seul presque la moitié du cholestérol β total .

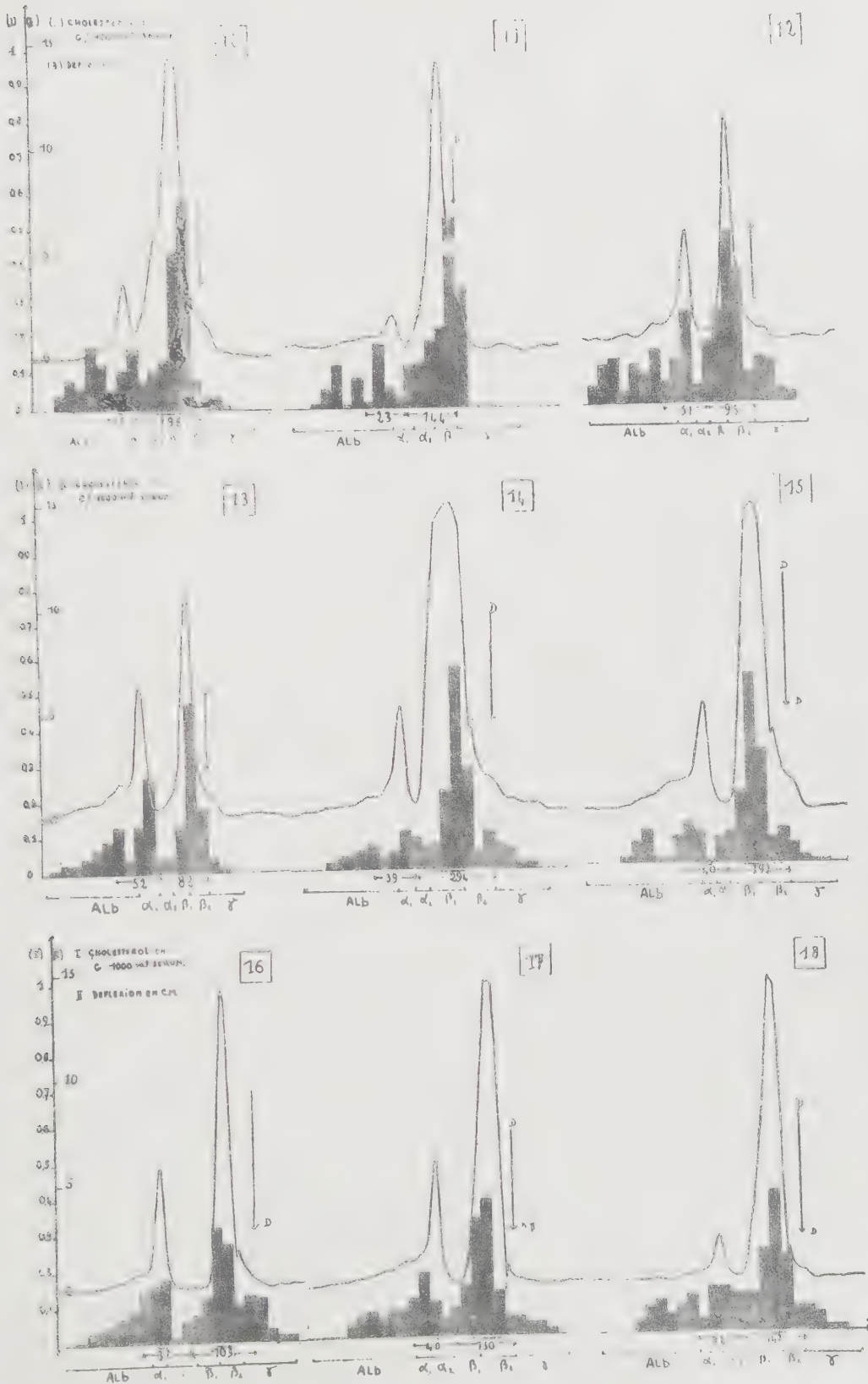
En étudiant des sérums pathologiques notamment du sérum provenant de sujets atteints d'angor d'effort (MEYER 1964) a pu montrer que ce β cholestérol subissait des modifications caractéristiques .

CONCLUSION .

- L'étude de l'histogramme du cholestérol chez 18 sujets normaux nous montre :
- qu'il n'est pas exactement superposable au lipidogramme .
 - l'existence de 3 fractions généralement bien individualisées .
 - la prédominance de la fraction β cholestérol et dans cette fraction, un pic se détachant très nettement, le β cholestérol maximum . Des expériences en cours de publication montrent que ce dernier pic présente un intérêt considérable dans l'athérosclérose .



Sérums normaux -



3^{ème} PARTIE

ETUDE SUR L'ANIMAL

INTRODUCTION

La seconde partie de ce travail était consacrée à l'étude du sérum humain normal en appliquant la technique décrite ici .

Le but de cette troisième partie est de montrer que cette technique consistant à faire un histogramme de cholestérol est également applicable au sérum de l'animal

En effet, pour faire avancer nos connaissances, nous avons continuellement besoin d'expérimenter sur l'animal ; or, on sait que des animaux très employés au laboratoire, comme le lapin, le rat, ont un taux de cholestérol beaucoup plus faible que celui de l'homme . Il s'agit donc de vérifier si avec des doses trois ou quatre fois plus faibles (cholestérolémie normale chez le lapin et le rat) cette méthode donne encore des résultats satisfaisants .

Nous comparerons nos résultats à ceux publiés par d'autres auteurs .

D'autre part, on rapportera les faits observés dans différentes hyperlipémies et hypercholestérolémies provoquées . Les agents utilisés pour provoquer cette hyperlipémie doublée d'une hypercholestérolémie étant l'administration orale de cholestérol, l'injection de triton et de cortisone .

ETUDE SUR LE LAPIN

plupart de nos études ont porté sur le lapin, il est facile chez lui de déclencher une hypercholestérolémie, laquelle entraîne plus ou moins rapidement une athérosclérose typique.

On rappellera tout d'abord les constantes biologiques chez l'animal normal.

ELQUES CONSTANTES BIOLOGIQUES CHEZ LE LAPIN NORMAL

A. Résultats donnés par différents auteurs

Dans une thèse sur l'athérosclérose spontanée et expérimentale LABROUSSE (1962) donne les chiffres suivants comme valeur moyenne chez le lapin :

- cholestérol total	0.60 par litre .
- lipides totaux	4 g par litre (avec d'assez grandes variations d'un sujet à l'autre) .
- lipoprotéines α	32 % des lipoprotéines totales .
- lipoprotéines β	50 % des lipoprotéines totales.

D'après BARR 1953 les lipoprotéines α sont plus riches en cholestérol, elles en contiennent 53 % alors qu'il n'y en a que 47 % dans les β .

- Absence de lipoprotéines du groupe Sf 10-20 . appelées en 1951 par GOFMAN lipoprotéines athérogènes .
- Dans son allure générale, le lipidogramme est semblable à celui de l'homme .

Dans "STANDARD VALUES IN BLOOD", les auteurs citent comme normales les chiffres suivants :

- cholestérol total	0,45 g par litre
- lipides totaux	2,23 g par litre

CRAWFORD (1959) pratique de électrophorèses en tampon véronal sur du sérum de lapin . Il fait ensuite un dosage du cholestérol sur le sérum total et sur les extraits chloroformiques obtenus à partir des fractions .

Les résultats : moyenne de dosages pratiqués sur plusieurs animaux, sont les suivants :

Cholestérol total	0,45 g
Cholestérol dans les α lipoprotéines	56 %
Cholestérol dans les β lipoprotéines	44 %

D'autres auteurs (HILLYARD 1955) appliquent la méthode d'ultracentrifugation de GOFMAN à l'étude des différents constituants lipidiques du sérum de lapin . Ils individualisent ainsi quatre fractions .

Fraction A, comprenant les lipoprotéines de faible densité c'est-à-dire inférieure à 1,063, correspond aux β lipoprotéines .

Fractions B et C groupent les lipoprotéines de densité supérieure à 1,063, en fait il s'agit des lipoprotéines α .

La fraction D contient très peu de lipides : elle est constituée essentiellement par les albumines et globulines .

Dans chacune de ces fractions, les auteurs dosent les lipides totaux puis le cholestérol libre et estérifié, les phosphoaminolipides, les acides gras .

Nous rapportons les résultats trouvés par ces auteurs .

TABLEAU 25

Concentration des lipides et du cholestérol dans 4 fractions lipoprotéiniques .

Résultats exprimés en mg pour 100 ml de sérum (d'après HILLYARD)

Lipoprotéines Fraction	Lipides totaux	Cholest. total
A	82	25
B	34	10
C	106	31
D	29	1
Somme des fractions	251	67

Ces résultats sont en accord avec ceux énoncés plus haut, en effet, il n'y a que 25 mg de cholestérol pour 100 ml de sérum, soit 37,3 % dans la fraction A qui représente les β lipoprotéines, alors que les α lipoprotéines (fractions B et C) en totalisent 41 mg pour 100 ml de sérum soit 62 % .

En résumé chez le lapin normal les lipides totaux sont compris entre 2,50 g et 4 g avec d'assez grandes variations; le cholestérol total se situe entre 0,45 g et 0,60 g et il est plus largement réparti dans les lipoprotéines α que dans les β) .

B . RESULTATS PERSONNELS

Ils ont été déterminés sur 12 lapins (sauf pour les lipides totaux qui ont été faits sur 6 lapins), les animaux sont à jeun depuis la veille . Le prélèvement du sang est pratiqué à la veine marginale de l'oreille .

1 . LIPIDES TOTAUX

Ils ont été dosés par la méthode de DELSAL chez 6 lapins . (Poids moyen 2,550 kg) .

Les résultats s'étagent entre 1,94 et 3,26 g avec un taux moyen de 2,49 g .

2 . LE LIPIDOGRAMME

Les conditions dans lesquelles le sérum a été soumis à l'électrophorèse diffèrent légèrement de celles décrites dans la première partie . On opère à 6° en tampon T.E.B. , mais le dépôt est de 60 μ l au lieu de 40 μ l, l'expérience a montré que même avec la dose de 60 μ l soumise à l'électrophorèse, l'extraction des bandelettes était totale . La durée de l'électrophorèse est limitée à 15 heures .

Ces deux modifications ont été apportées afin d'obtenir un lipidogramme et un cholestérogramme satisfaisants malgré la faible teneur en lipides et en cholestérol

Le lipidogramme est coloré par l'Oil red-O . Il se présente comme celui d'un sérum humain ; en partant du dépôt, on note un premier pic important, non symétrique . La branche du côté du dépôt est généralement en pente plus douce que l'autre . Ce pic couvre les β_1 et β_2 globulines c'est le clocher des β lipoprotéines, il est suivi d'un second pic toujours présent bien que d'intensité beaucoup plus faible qui représente les α lipoprotéines .

En avant des α lipoprotéines dans la zone des albumines, il y a dans quelques cas une légère fixation du colorant, il en est de même dans la région des γ globulines

Donc les α et β lipoprotéines ne représentent pas les lipoprotéines totales mais environ 90 % . Si on considère les unités densitométriques enregistrées qui sont le reflet des lipides totaux, on constate des variations considérables d'un animal à

l'autre, LABROUSSE avait fait la même remarque .

Les lipoprotéines β sont égales à 80 % tandis que les α ne représentent que 10 % des lipoprotéines totales . Ces chiffres diffèrent assez nettement de ceux donnés par d'autres auteurs . Ceci s'explique par l'emploi du tampon T.E.B. on sait que les résultats des électrophorèses sont très étroitement liés aux conditions opératoires .

TABLEAU 26

Lipoprotéines chez le lapin normal .

LAPIN n°	LIPOPROT. totales	LIPOPROT. β	LIPOPROT. α	β / α
1	93	82	11	7.45
2	144	119	12	9.91
3	139	115	5	23
4	92	73	6	12.1
5	102	74	1.7	6.45
6	220	178	11	16.2
7	45	27	9	3
8	84	66	7	9.4
9	150	122	8	15.2
10	203	104	55	1.89
11	300	235	29	8.1
12	300	262	10	26.2
M	156	121	14.5	8.34

3 . Le cholestérol

Le cholestérol total a été déterminé sur bande après électrophorèse, il est égal à la somme des différentes fractions . Pour douze lapins le taux moyen est de 0,58 g par litre, avec des résultats assez groupés puisque les chiffres varient entre 0,50 g et 0,71 g . (tableau 27) .

L'histogramme du cholestérol ressemble dans les grandes lignes à celui de l'homme . Correspondant aux β lipoprotéines on trouve la fraction la plus importante du cholestérol, cette fraction n'est pas homogène, dans presque tous les cas une des bandelettes est plus riche en cholestérol, nous avons déjà signalé ce fait à propos du sérum humain normal et nous avons appelé ce pic cholestérol β maximum, il représente pour le lapin le $1/3$ du cholestérol β total .

Le cholestérol contenu dans les autres parties de l'histogramme est faible cependant nous pouvons noter l'amorce de deux fractions distinctes : une située au niveau des α lipoprotéines c'est-à-dire au niveau des α_1 et α_2 globulines l'autre au niveau des albumines .

Le cholestérol est réparti de la façon suivante dans les différentes fractions (nous donnons la moyenne des 12 lapins) :

Le cholestérol β est égal à 0,26 g soit 46 % du cholestérol total .

La fraction α contient 0,09 g ce qui représente 16 % du cholestérol total . Nous trouvons 0,16 g dans la zone des albumines soit 28 % et 0,05 g dans celle des γ globulines ce qui équivaut à 10 % du cholestérol total .

Les résultats divergent de ceux cités par BARR ou LABROUSSE, ceci s'explique par le fait que nous avons pu déterminer une fraction cholestérolique correspondant aux α globulines et une autre correspondant aux albumines .

TABLEAU 27

Cholestérol des différentes fractions électrophorétiques
chez le lapin normal .

LAPINS	CT calculé	CHOLEST. β		Cholest. α	Cholest. Alb.	Cholest. γ
		β total	C β M			
1	0,50	0,25	0,12	0,04	0,14	0,07
2	0,61	0,30	0,09	0,08	0,17	0,07
3	0,50	0,22	0,06	0,04	0,16	0,07
4	0,58	0,30	0,15	0,06	0,12	0,05
5	0,67	0,24	0,06	0,10	0,29	0,04
6	0,56	0,26	0,06	0,07	0,15	0,08
7	0,64	0,36	0,09	0,12	0,14	0,02
8	0,64	0,34	0,10	0,11	0,11	0,05
9	0,52	0,15	0,06	0,08	0,21	0,07
10	0,51	0,16	0,06	0,14	0,15	0,05
11	0,54	0,24	0,09	0,12	0,12	0,07
12	0,71	0,25	0,09	0,15	0,23	0,07
M	0,58	0,26	0,08	0,09	0,16	0,05

CT . : cholestérol total

C. β M. : cholestérol β maximum

Tous les résultats sont exprimés en g de cholestérol pour 1 000 ml de sérum.

En conclusion

Les recherches décrites dans ce chapitre montrent qu'il est possible d'obtenir chez le lapin normal un lipidogramme et un histogramme du cholestérol en opérant dans des conditions bien définies .

Le lipidogramme se présente comme chez l'homme, sous forme de 2 bandes γ et β . Ces dernières sont moins accusées que chez l'homme .

Le cholestérogramme se présente à l'état normal sous forme de 2 clochers principaux, moins denses que chez l'homme, en particulier le cholestérol α est considérablement amenuisé .

II . INGESTION DU CHOLESTEROL

A . Expériences de différents auteurs

L'hypercholestérolémie et l'hyperlipémie après ingestion de cholestérol sont maintenant des faits bien connus : il en a été fait diverses expériences .

- ou bien on détermine une athérosclérose expérimentale en donnant pendant des semaines un régime riche en cholestérol .
- ou bien on provoque une hypercholestérolémie transitoire par une seule ingestion de cholestérol, ce qui peut permettre d'étudier l'absorption du cholestérol, ses inhibiteurs ou tout autre facteur influençant son métabolisme .

ANITCHKOFF et CHALATOV ont été les premiers à établir un lien entre athérosclérose provoquée et hypercholestérolémie . En effet ils ont réussi à faire apparaître des lésions athéroscléreuses chez le lapin, en enrichissant son régime en cholestérol .

La cholestérolémie qui atteint 30 fois la normale s'accompagne d'une hyperlipémie, qui peut être 8,7 fois supérieure à la normale, alors que les animaux n'ont reçu que du cholestérol, sans adjonction de corp gras, c'est ce que révèlent les expériences de WANG et collaborateurs.

L'hyperlipémie transitoire a également été bien étudiée FRIEDMANN et BYERS intubent du cholestérol dissous dans de l'huile d'olive à raison de 400 mg par kg de poids, ils constatent qu'après 72 h le cholestérol est passé de 91 mg/100 ml de sérum à 326 mg/100 ml

WOLFF R., BRIGNON J.J. pour étudier l'absorption intestinale du cholestérol ont provoqué une hypercholestérolémie passagère en faisant ingérer à des lapins 0,50 g par kg de cholestérol, elle est maximum après 24 h, le cholestérol passe alors de 0,68 g à 1,30 g

Dans tous ces travaux seules les variations globales de la cholestérolémie sont envisagées.

Nous avons repris ces expériences sur l'ingestion d'une dose unique de cholestérol en nous attachant aux modifications du cholestérogramme.

B. Description de l'expérience

L'expérience porte sur quatre lapins de poids moyen = 1,900 kg. Sur ces lapins à jeûn depuis 24 h, on a fait un cholestérogramme, puis à l'aide d'une sonde on leur intube par kg de poids, 0,50 g de cholestérol dissous dans de l'huile d'olive. Le sang a été prélevé 24 h et 48 h après, à la veine marginale de l'oreille.

Les électrophorèses ont été pratiquées avec les modifications décrites plus haut. Quant au dosage, du cholestérol, il est conduit exactement de la même façon que dans le cas du sérum humain. 20 bandelettes, éluee chacune dans 1 ml du réactif au perchlorure de fer. On reprend 0,8 ml d'éluat, on y ajoute 0,48 ml d'acide

sulfurique pur, on abandonne à l'obscurité pendant 1/2 h la coloration se développe et on lit au spectrophotomètre BECKMAN à 560 mμ.

c. , Résultats

Les résultats sont consignés dans les tableaux 28 et 29 .

Comme on l'a déjà dit le cholestérol est exprimé en prenant comme repères ceux fournis par les fractions du protéinogramme .

Les résultats obtenus chez les différents animaux ne sont pas exactement superposables, mais on note dans tous les cas des variations dans le même sens du lipidogramme et du cholestérogramme .

1 . Variations du lipidogramme

- Il y a augmentation de la lipémie avec un maximum 24 h après l'ingestion pour deux lapins, et 48 h après pour les deux autres .

Le coefficient d'augmentation varie entre 46 % et 91 % avec une moyenne de 57,5 % .

- Les α lipoprotéines qui sont faibles mais existent toujours chez le lapin normal diminuent et même disparaissent tandis que les β lipoprotéines augmentent nettement .

2 . Variations du cholestérogramme

- Dans tous les cas le cholestérol total s'est élevé, les variations s'étalent entre 24 % et 86 % avec une moyenne de 52 % . Il y a donc une augmentation plus importante de la lipémie que du cholestérol, ceci est peut être imputable à l'excipient (dans nos expériences = huile d'olive) ; cependant nous avons déjà signalé les travaux WANG qui note, une hyperlipémie alors que le cholestérol était administré dans un véhicule non gras .

- Les variations de l'histogramme du cholestérol sont plus intéressantes à étudier . Nous avons vu que chez le lapin normal le cholestérol β représentait 46 % du cholestérol total et 28 % pour le cholestérol albumine .

TABLEAU 28

EVOLUTION DU CHOLESTEROGRAMME APRES INGESTION
DE 0,50 g DE CHOLESTEROL

LAPIN 14

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β β total	CM β	Cholest α	Cholest Alb	Cholest γ
avant ingest. cholestérol	93	0,50	0,25	0,12	0,04	0,14	0,07
24 h après ingestion	178	0,93	0,46	0,16	0,24	0,13	0,09
48 h après ingestion	68	0,48	0,22	0,08	0,04	0,16	0,05

LAPIN 19

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β β total	CM β	Cholest α	Cholest alb	Cholest γ
avant l'ingest. cholestérol	144	0,61	0,36	0,09	0,08	0,17	0,07
24 h après ingestion	197	0,76	0,39	0,13	0,09	0,21	0,06
48 h après ingestion	210	0,61	0,28	0,13	0,07	0,17	0,08

L. P. = lipoprotéines totales exprimées en unités densitométriques

C. T. cholestérol total en g pour 1 000 ml de sérum

C. M. β = cholestérol maximum β en g pour 1 000 ml de sérum

Cholestérol α , β Alb. γ , exprimé par rapport au protéinogramme

TABLEAU 29

EVOLUTION DU CHOLESTEROGRAMME APRES
INGESTION DE 0,50 g DE CHOLESTEROL

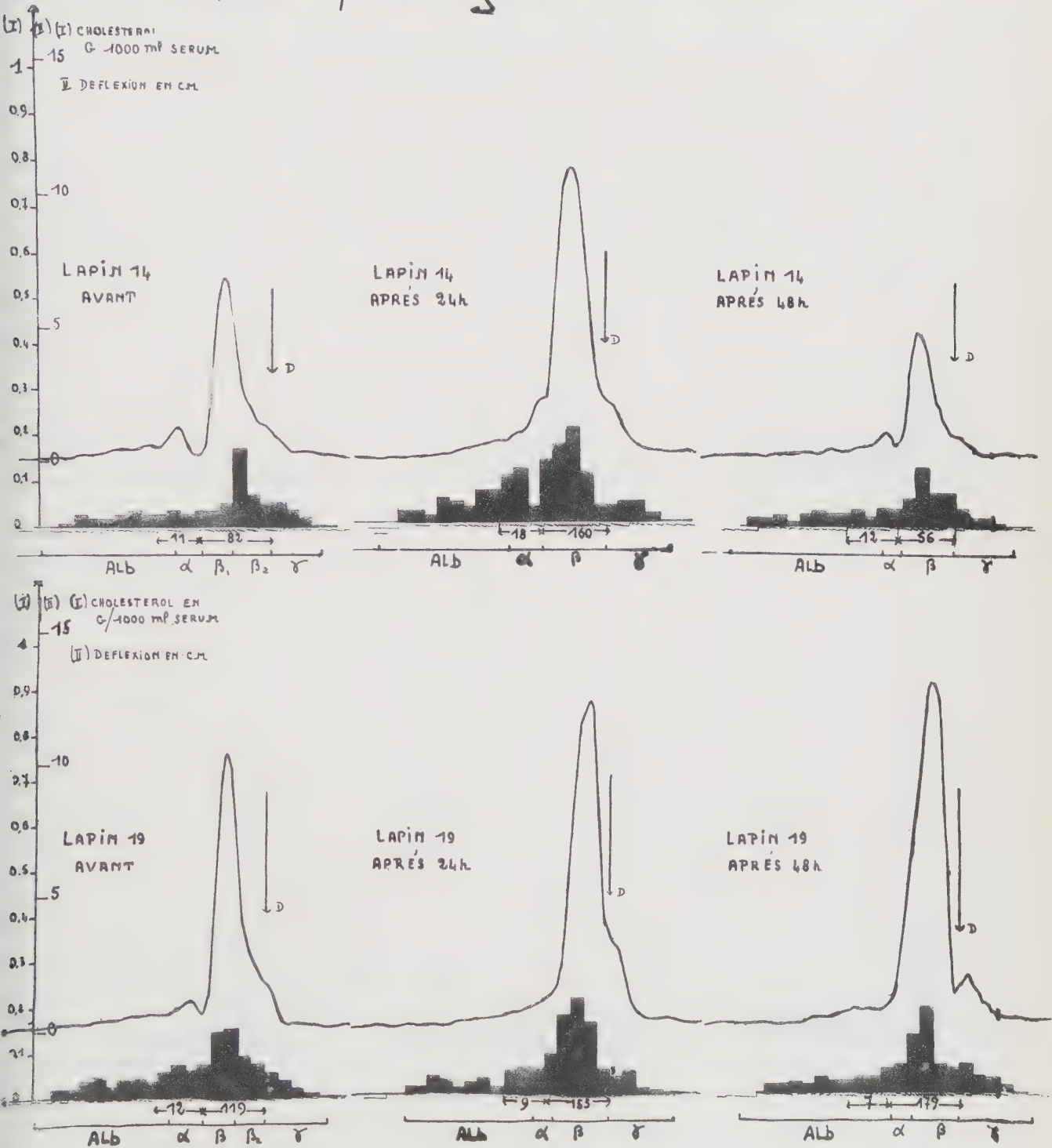
LAPIN 20

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest Alb.	Cholest γ
			β total	CM β			
avant ingest. cholestérol	130	0,50	0,22	0,06	0,04	0,16	0,07
24 h après ingestion	148	0,74	0,43	0,13	0,07	0,18	0,05
48 h après ingestion	203	0,86	0,45	0,16	0,03	0,23	0,04

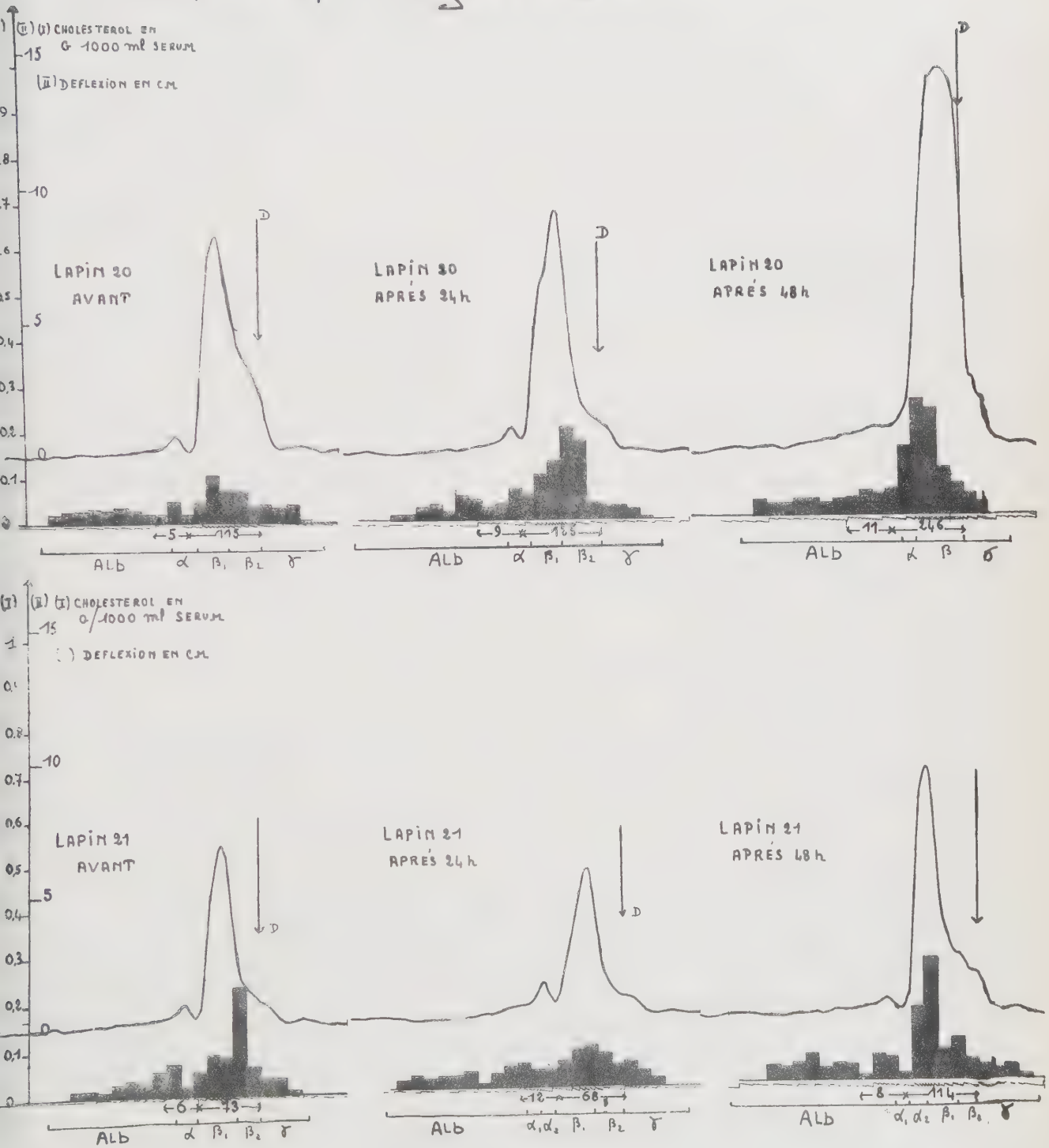
LAPIN 21

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest alb.	Cholest γ
			β total	CM β			
avant ingest. cholestérol	92	0,58	0,34	0,15	0,06	0,12	0,05
24 h après ingestion	98	0,54	0,23	0,09	0,04	0,20	0,06
48 h après ingestion	137	0,75	0,42	0,17	0,08	0,18	0,06

Lapins ayant ingéré du cholestérol



Lapins ayant ingéré du cholestérol



On note après injection de cholestérol que seule cette fraction β a augmenté d'une façon appréciable, elle passe de 0,29 g à 0,38 g après 24 h . Le cholestérol maximum subit la même augmentation alors que les fractions α . albumine et γ globulines sont inchangées . Il y a une seule exception chez le lapin 14 , dont le cholestérol α a passé en 24 heures de 0,04 g à 0,24 g .

D . Conclusion

L'ingestion d'une dose unique de cholestérol a provoqué une hyperlipémie et une hypercholestérolémie . Cependant, il faut reconnaître tant pour l'une que pour l'autre que l'augmentation est faible .

La courbe du lipidogramme change d'aspect, les β lipoprotéines augmentent tandis que les α tendent à disparaître .

L'augmentation du cholestérol porte presque exclusivement sur la fraction β . En ce qui concerne la courbe en cloche représentant le β cholestérol, seule sa hauteur a varié .

III . INJECTION DE CORTISONE

A . Travaux de différents auteurs

On sait, depuis quelques années déjà, que l'injection de cortisone déclenche des perturbations du métabolisme des lipides qui se traduisent par une augmentation de toutes les classes des lipides et apparition d'un sérum opalescent . ADELSBERG (1950) fut un des premiers à constater ce phénomène en traitant des malades par la cortisone pendant un certain laps de temps (de 6 à 105 jours) .

En partant de ces observations : influence de la cortisone sur le métabolisme des lipides, d'autres auteurs ont cherché le rôle qu'elle pouvait jouer dans la pathogénie de l'athérosclérose .

DURY (1955 - 1959) expérimenta la cortisone sur des lapins qui étaient également soumis à un régime riche en cholestérol donc générateur de lésions athéromateuses et il constata que la cortisone avait un rôle protecteur; COOK (1953) fit la même observation et KOBERNIK (1950) remarqua également la protection exercée par la cortisone chez des lapins porteurs d'un diabète à l'alloxan .

SEIFER et BAEDER (1957) expliquent l'action de la cortisone de la façon suivante : elle déclencherait la formation ou la libération d'une hormone mobilisatrice de lipides . En mobilisant les lipides elle empêcherait donc leur dépôt sur les artères . Mais des recherches personnelles comme celles de STEINBERG (1963) n'ont pu mettre en évidence l'existence même d'une telle hormone , de sorte qu'il ne convient pas de retenir l'hypothèse émise par ces auteurs .

B . Expérience personnelle

Comme dans le cas de l'injection du cholestérol nous avons repris les expériences en nous attachant à suivre non pas l'évolution globale du cholestérol mais les variations du cholestérogramme .

Nous savons qu'après un certain nombre d'injections de cortisone à des lapins , leur plasma devient opalescent . Dans cette étude nous suivrons les variations du cholestérogramme jusqu'à apparition de l'opalescence , cette expérience a été faite sur quatre lapins (poids moyen 2,500 kg) .

A chacun de ces lapins , on fait avant tout traitement , une prise de sang , le cholestérogramme fait sur ce sérum sert de témoin .

Puis on leur injecte quotidiennement par voie intramusculaire 5 mg/kg de cortisone (suspension à 2,5 % d'acétate de cortisone Roussel) on pratique des dosages après 2 , 6 , et 10 injections .

C . Résultats

(Tableaux 30 et 31 - graphiques).

Les animaux ont réagi différemment à la cortisone .

Le lapin 18 a montré, très rapidement une opalescence marquée du sérum .
Après 6 injections de cortisone son sérum mesuré au spectrophotomètre Beckman à 700 m μ accusait une densité optique de 1.600 alors que la densité optique d'un sérum normal se situe entre 0,075 et 0,150 .

Les lapins 15 et 16 se sont comportés de façon semblable : après 10 injections la densité optique de leur sérum était de 1.200 pour l'un et 1.500 pour l'autre . Quant au n° 17, il s'est montré réfractaire, après 10 injections de cortisone son sérum était toujours limpide , nous avons poursuivi jusqu'à 16 injections sans obtenir aucune opalescence .

1 . Variation du lipidogramme

Les lipides totaux - si l'on considère que les unités densitométriques enregistrées sur le lipidogramme varient parallèlement aux lipides totaux (WOLFF 1963) - ont augmenté de façon très importante ; les unités densitométriques se sont élevées de 2 à 8 fois selon les lapins avec une moyenne de 4 fois et demie .

Les α lipoprotéines, qui existent avant le traitement à la cortisone, rapidement disparaissent et nous assistons au développement du pic des β lipoprotéines qui passent de 85 unités densitométriques avant injection de cortisone à 168 après 2 injections, 315 après 6 et 323 après 10 injections . Il apparaît également peu à peu une traînée de chylomicrons . Nous avons vu qu'en tampon T.E.B. le phénomène de traînée n'existe pas pour un sérum limpide, lorsqu'il s'agit de sérum cortisoné petit à petit le sérum se charge en lipides et l'opalescence apparaît lorsque les lipides sont en trop grande quantité pour être solubilisés . Cette surcharge progressive se traduit par l'apparition et le développement de la traînée des chylomicrons .

TABLEAU 30

VARIATION DU CHOLESTEROGRAMME
APRES INJECTIONS DE CORTISONE

LAPIN 15

Nombre inject. de cortisone	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol B		Cholest α	Cholest alb.	Cholest γ
			β total	C β M			
0	102	0,67	0,24	0,06	0,10	0,29	0,04
2	51	0,63	0,36	0,09	0,07	0,09	0,10
6	240	0,64	0,39	0,11	0,06	0,14	0,05
10	520	1,16	0,77	0,20	0,08	0,14	0,02
sérum ultracentrifuge	300	1,10	0,78	0,21	0,09	0,14	0,08

LAPIN 16

Nombre inject. de cortisone	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol B		Cholest α	Cholest alb.	Cholest γ
			β total	C β M			
0	220	0,56	0,26	0,06	0,07	0,15	0,08
2	180	0,72	0,39	0,09	0,13	0,16	0,04
6	343	0,97	0,66	0,16	0,09	0,15	0,08
10	510	1,10	0,62	0,17	0,13	0,27	0,08
sérum ultra centrifugé	350	1,01	0,71	0,21	0,14	0,12	0,05

L. P. = lipoprotéines totales exprimées en unités densitométriques

C. T. = cholestérol total exprimé en g par 1 000 ml de sérum

C. M. β = cholestérol β maximum exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

TABLEAU 31

VARIATIONS DU CHOLESTEROGRAMME
APRES INJECTIONS DE CORTISONE

LAPIN 17

Nombre inject. de cortisone	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol B β total C β M		Cholest α	Cholest alb.	Cholest γ
0	45	0,64	0,36	0,09	0,12	0,14	0,02
2	170	0,60	0,39	0,10	0,07	0,15	0
6	295	0,73	0,46	0,10	0,06	0,13	0,08
10	170	0,62	0,27	0,11	0,14	0,17	0,05

LAPIN 18

Nombre inject. de cortisone	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol B β total C β M		Cholest α	Cholest alb.	Cholest γ
0	84	0,64	0,34	0,10	0,11	0,11	0,05
2	370	1,02	0,58	0,21	0,14	0,17	0,12
6	730	1,86	1,05	0,28	0,37	0,19	0,24
après 6 injections sérum ultracen- trifugé	171	0,93	0,66	0,21	0,09	0,12	0,04

2 . Variations du cholestérogramme

Le cholestérol total a également augmenté, mais dans des proportions beaucoup moindres que celles des lipides, généralement il a doublé après 6 ou 10 injections de cortisone (taux moyen d'augmentation - 96 %) moyenne des augmentations les plus importantes . DURY avait déjà remarqué que l'augmentation des lipides sanguins due à la cortisone portait surtout sur les graisses neutres et peu sur les autres constituants lipidiques , nous donnons dans le tableau suivant des résultats déterminés par DURY .

TABLEAU 32

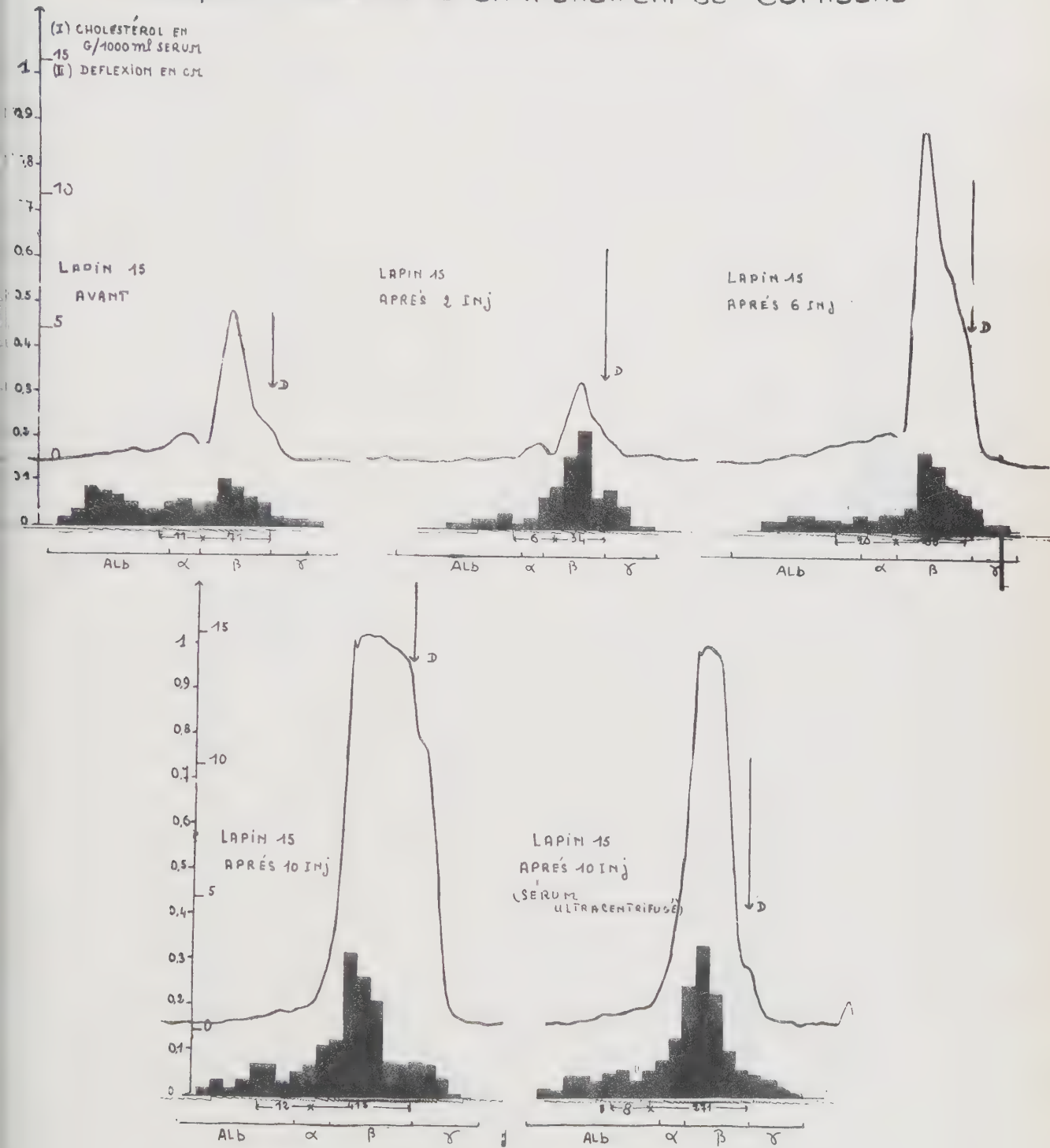
Effet de 10 mg de cortisone injectés pendant 14 jours à des lapins , sur la répartition de leurs lipides						
Groupes	Lipides totaux	Phospho lipides	Cholestérol		ester.	graisses neutres
			total	libre		
Témoins	448	158	105	31	74	130
Cortisone	1225	246	122	66	56	845

Les chiffres représentent des mg pour 100 ml de sérum .

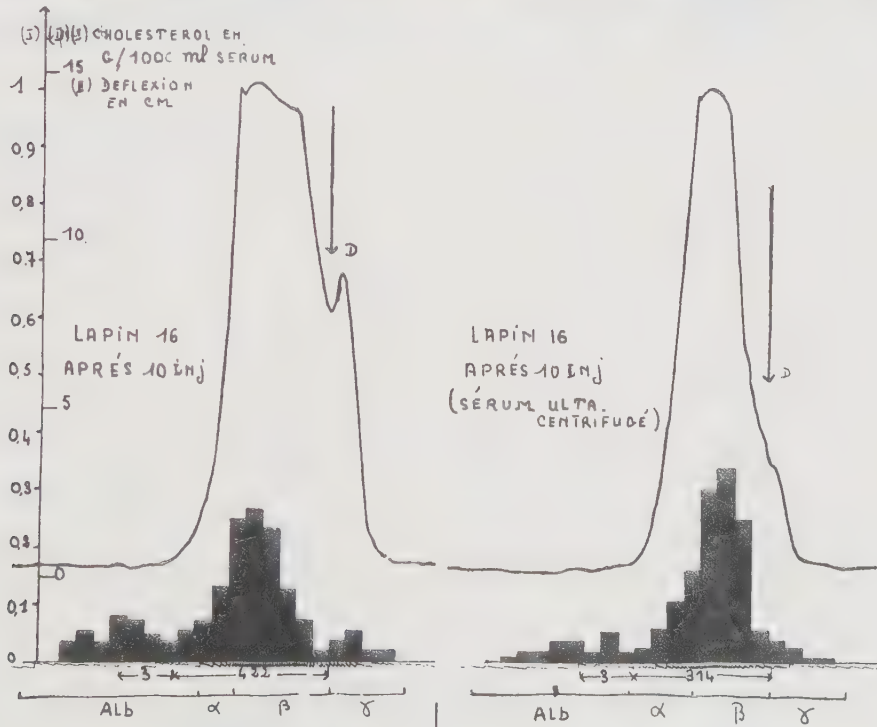
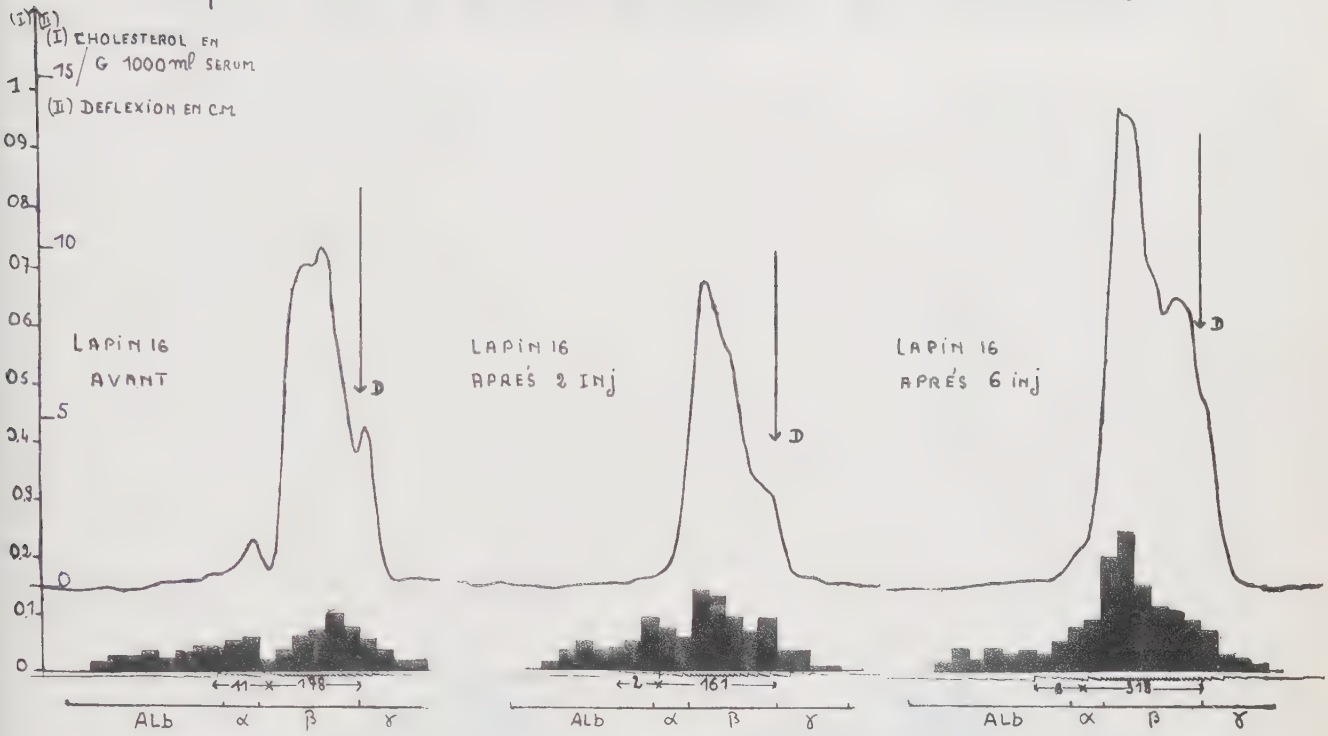
3 . Histogramme du cholestérol

Comme dans le cas de l'ingestion du cholestérol l'augmentation porte uniquement sur le β cholestérol . En effet, celui-ci passe de 0,30 g en moyenne avant les injections pour atteindre 0,69 g après 10 injections . Donc cette fraction du cholestérol a plus que doublé . Le cholestérol maximum qui représente 25 % de la fraction β au début de l'expérience est égal à 27 % lorsque l'augmentation est maximum . Dans ce cas , il ne fait que refléter les variations du cholestérol β total . Les fractions α , albumine et γ cholestérol ne subissent pratiquement aucune variation.

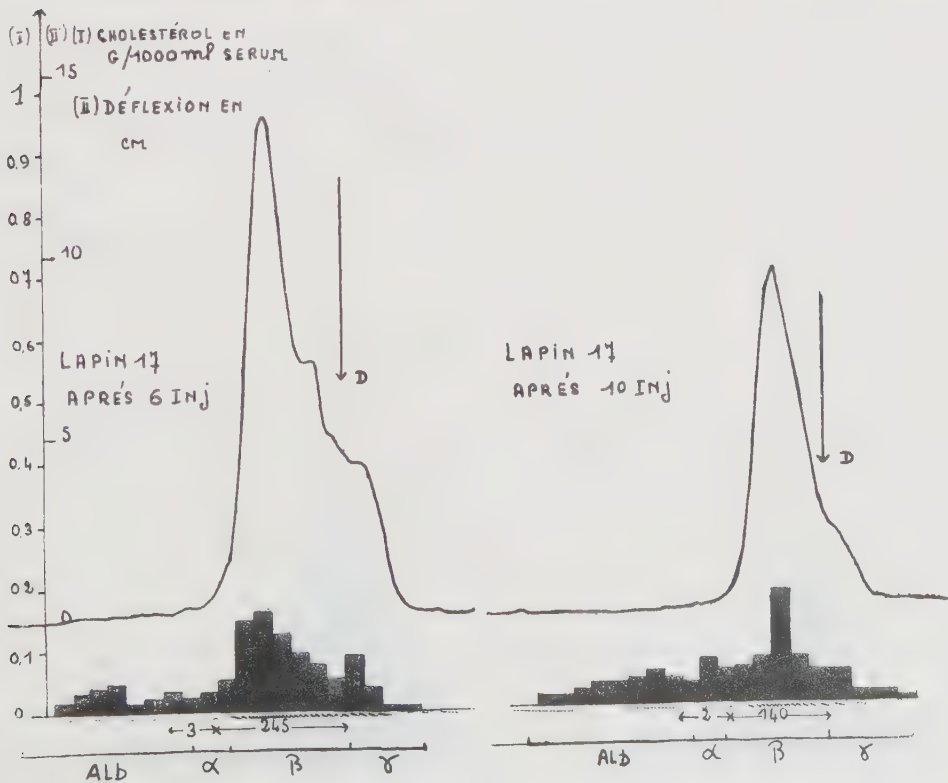
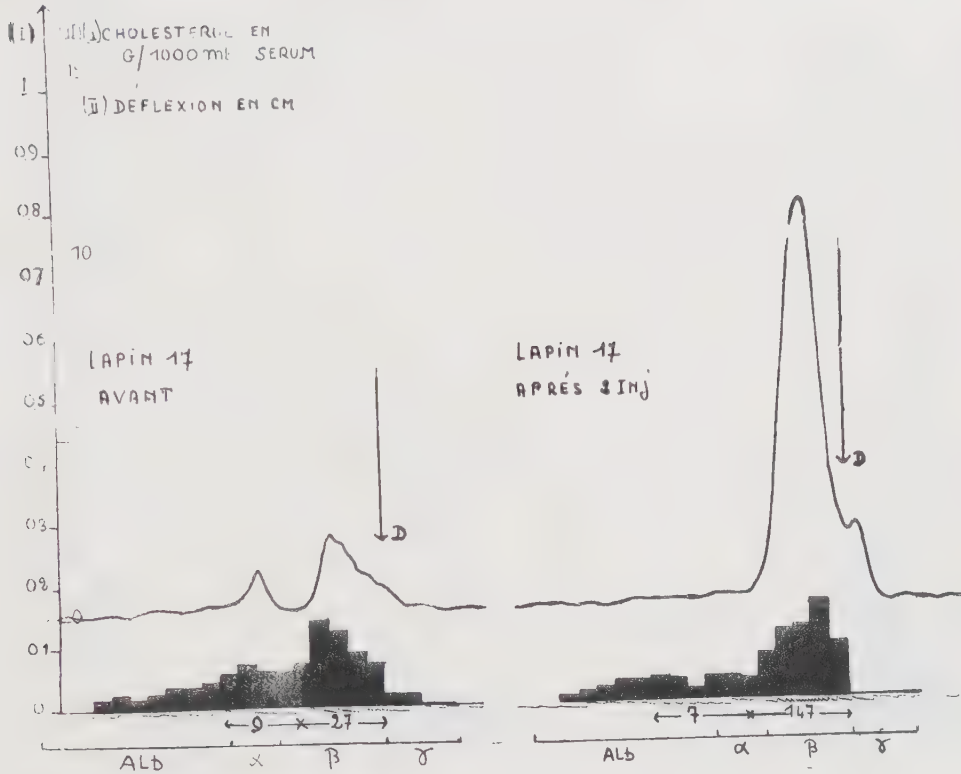
Lapins soumis à un traitement de Cortisone



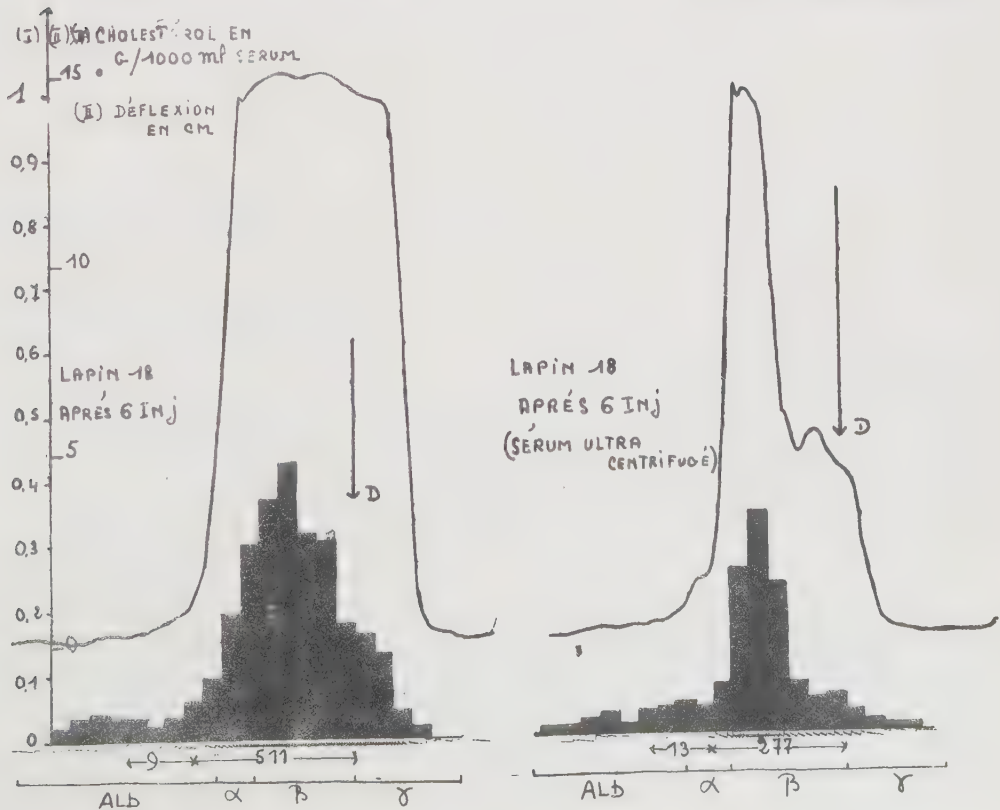
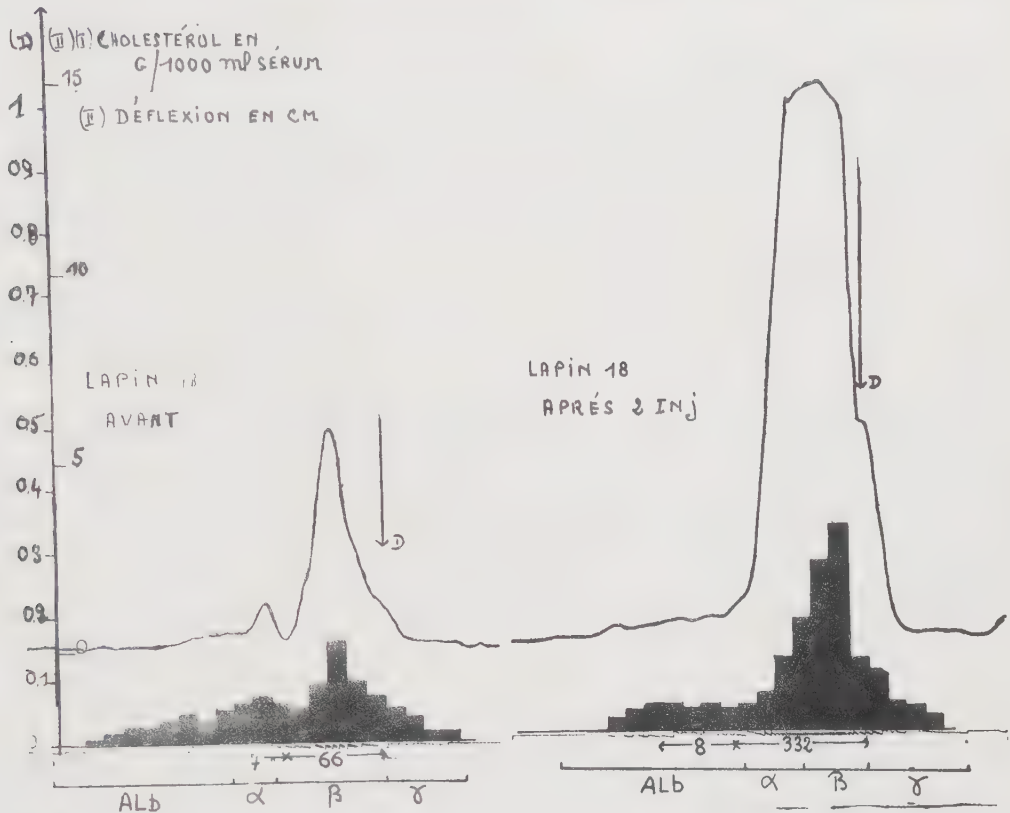
Lapins soumis à un traitement de Cortisone.



Lapins soumis à un traitement de Cortisone.



Lapins soumis à un traitement de Cortisone.



Le cholestérol α passe de 0,10 g avant injection de cortisone à 0,11 g après 10 injections .

Le cholestérol-albumine varie de 0,17 g à 0,18 g, le cholestérol γ subit une augmentation trop légère pour qu'elle ait une signification (égal à 0,04 g au début de l'expérience, il atteint 0,08 g après 10 injections) .

D . Conclusion

On peut dire que l'injection de cortisone provoque une hyperlipémie qui n'atteint pas de la même façon les différents constituants lipidiques ; les graisses neutres surtout sont augmentées ce qui se traduit par l'apparition d'une traînée de chylomicrons qui ne semblent pas contenir de cholestérol, après ultracentrifugation le cholestérol total de 2 lapins est resté le même alors que les unités densitométriques diminuent .

Cependant, bien qu'en proportion moindre que les lipoprotéines, le cholestérol est augmenté, cette augmentation porte exclusivement sur la fraction β ignorant complètement le cholestérol α , albumine et γ globulines .

IV . INJECTION DE TRITON

A . Travaux de différents auteurs

Le triton WR 1339 fait partie des détergents, il s'agit d'un alcoylphénol condensé avec l'oxyde d'éthylène et sulfaté . C'est un corps tensio-actif non ionisé . Ces corps - les polyoxyéthyl esters - ont rapidement trouvé des applications en biochimie et en clinique .

JONES et Coll. utilisent le Tween 80 (polyoxyéthylène sorbitan monooléate) pour la propriété qu'il a de rendre plus fines et plus homogènes les émulsions de lipides et donc de permettre leur meilleure absorption au niveau de la muqueuse intestinale .

Le Triton déclenche chez tous les animaux, chien (SCANU 1961-1962), Cobaye (JANICKI 1962) lapin (REBER 1961) et rat (CHOW 1952) une hyperlipémie, et une hypercholestérolémie. Des auteurs se sont servis de cet effet hyperlipémiant comme test pour différencier les substances inhibant la synthèse des lipides et celles ayant une action sur la lipolyse (REBER).

Connaissant l'hyperlipémie provoquée par l'injection de Triton les auteurs ont essayé d'en déterminer la cause.

FRIEDMANN et BYERS (1952 - 1957) pensent que l'hyperlipémie et l'hypercholestérolémie ne sont pas dues à un changement de la fonction hépatique, ou intestinale mais au sang lui-même qui retiendrait plus de cholestérol, ce phénomène étant imputable à la variation des propriétés d'absorption des protéines plasmatiques après injection de Triton.

FRANTZ et HINKELMAN (1955) dans des expériences menées sur le rat, donnent comme cause de l'hyperlipémie et de l'hypercholestérolémie, une accélération de la synthèse au niveau du foie.

Pour JANICKI et ARON (1962) l'hyperlipémie induite par le Triton serait due à l'altération des lipoprotéines du plasma, altération mal connue mais qui se traduirait par l'inhibition de l'activité de la lipoprotéine-lipase.

Nous voyons donc que, si nous connaissons l'effet d'injection de Triton, les causes en sont encore très mal connues. Pour notre part nous allons étudier l'hypercholestérolémie déclenchée par une injection unique de triton et les éléments supplémentaires que l'application de notre méthode permet de déterminer.

B . Expérience personnelle

Les expériences ont été faites sur quatre lapins (Poids moyen 2,500 kg).

Ces animaux reçoivent en injection intraveineuse 150 mg par kg de Triton WR 1339 du laboratoire Winthrops dilués dans de l'eau physiologique - Les

prises de sang sont faites

avant l'injection

48 heures après

6 jours après

Nous avons choisi ces intervalles de temps, car d'après les courbes établies par REBER 1961, l'hypercholestérolémie maximum se situe 48 heures après l'injection et la décroissance est amorcée après 6 jours .

C . Résultats

(Nous donnons les tableaux et graphiques pages suivantes) .

Les résultats obtenus sont extrêmement spectaculaires, en 48 heures il s'est développé une hyperlipémie et une hypercholestérolémie considérables bien que le plasma reste parfaitement limpide

De même que pour les autres stimuli les réponses des différents animaux vont dans le même sens sans cependant être identiques .

1 . Variations du lipidogramme

Contrairement à ce qui se passe dans les autres cas, l'hyperlipémie est ici moins importante que l'hypercholestérolémie ce qui peut expliquer que le sérum demeure limpide . L'augmentation moyenne des lipides est de 97 % après 48 heures et 15 % après 6 jours . On peut donc considérer qu'après 6 jours la lipémie est revenue approximativement à la normale . ceci est confirmée par la réapparition sur le lipidogramme des α lipoprotéines qui avaient disparu pendant la phase d'intense hypercholestérolémie .

2 . Variations du cholestérogramme

Le Triton est avant tout un hypercholestérolémiant . Le cholestérol total a augmenté dans de très larges proportions . Si on considère la moyenne des 4 lapins ,

TABLEAU 33

VARIATIONS DU CHOLESTEROGRAMME ET DU LIPIDOGRAMME
APRES UNE INJECTION DE TRITON

LAPIN 23

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest alb	Cholest γ
			β total	CM β			
avant triton	300	0,54	0,24	0,09	0,12	0,12	0,07
48 h après	490	2,31	1,74	0,71	0,32	0,13	0,12
6 jours après	283	1,83	1,41	0,47	0,13	0,15	0,12

LAPIN 24

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest alb	Cholest γ
			β total	CM β			
avant triton	300	0,71	0,25	0,09	0,15	0,23	0,07
48 h après	345	2,32	1,18	0,69	0,08	0,08	0,86
6 jours après	430	1,47	0,86	0,33	0,29	0,22	0,09

TABLEAU 34

VARIATIONS DU CHOLESTEROGRAMME ET DU
LIPIDOGRAMME APRES UNE INJECTION DE TRITON

LAPIN 12

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	cholest alb	Cholest γ
			β total	CM β			
avant triton	150	0.52	0.15	0,06	0,08	0,21	0,07
48 h après	363	1.44	0,99	0,34	0,11	0,18	0,15
6 jours après	173	1.03	0,66	0,16	0,13	0,16	0,07

LAPIN 22

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest alb	Cholest γ
			β total	CM β			
avant triton	203	0,51	0,16	0,06	0,14	0,15	0,05
48 h après	245	1,20	0,60	0,21	0,08	0,40	0,11
6 jours après	218	0,69	0,29	0,10	0,18	0,13	0,08

L. P. = lipoprotéines totales exprimées en unités densitométriques

C. T. = cholestérol maximum exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

C. M. B. = cholestérol maximum exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

on voit que le cholestérol total est passé de 0,57 g avant l'injection à 1,81 g 24 h après l'injection ce qui représente une augmentation de 206,5 % et 6 jours après l'injection le taux moyen est encore de 1,25 alors qu'à ce moment là, la lipémie est redevenue normale .

Les histogrammes du cholestérol présentent des différences assez marquées selon les animaux, 2 lapins ont réagi violemment à l'injection de Triton, le cholestérol a augmenté considérablement , pour l'un il a été multiplié par 7 et pour l'autre par 5 .

Pour les deux autres les variations sont moins spectaculaires . Le cholestérol α et le cholestérol albumine n'ont pas changé, sauf chez le lapin 22 où le second a subi une augmentation non négligeable .

Reprenons plus en détail cette étude du cholestérogramme en nous attachant aux variations moyennes .

L'hypercholestérolémie porte à peu près exclusivement sur le cholestérol β . Celui-ci est de 0,20 g avant injection de triton et représente 35 % du cholestérol total, 24 heures après l'injection, il est passé à 1,12 g soit 67 % du cholestérol total, et après 6 jours il est encore égal à 0,80 g, c'est-à-dire à 63 % du cholestérol total .

Le cholestérol β maximum suit la même évolution . Avant injection, il représente 35 % du cholestérol β ; 48 heures après, il est égal à 43 %, et à 32 % 6 jours après . Le cholestérol β maximum équivaut approximativement à la même fraction du cholestérol β , bien qu'à la phase la plus intense de l'hypercholestérolémie, il y ait une légère dissociation entre les augmentations de ces deux fractions . Ce fait est à noter, car dans certains cas pathologiques, il n'y a pas parallélisme entre augmentation du cholestérol β total et cholestérol β maximum, ce dernier subissant une élévation plus importante .

Le cholestérol α et le cholestérol albumine dans l'ensemble ne subissent pas de changements significatifs . Le cholestérol α passe de 0,12 g à 0,15 g et 0,18 g tandis que le cholestérol albumine est égal à 0,17 g, puis 0,22 g et enfin 0,16 g .

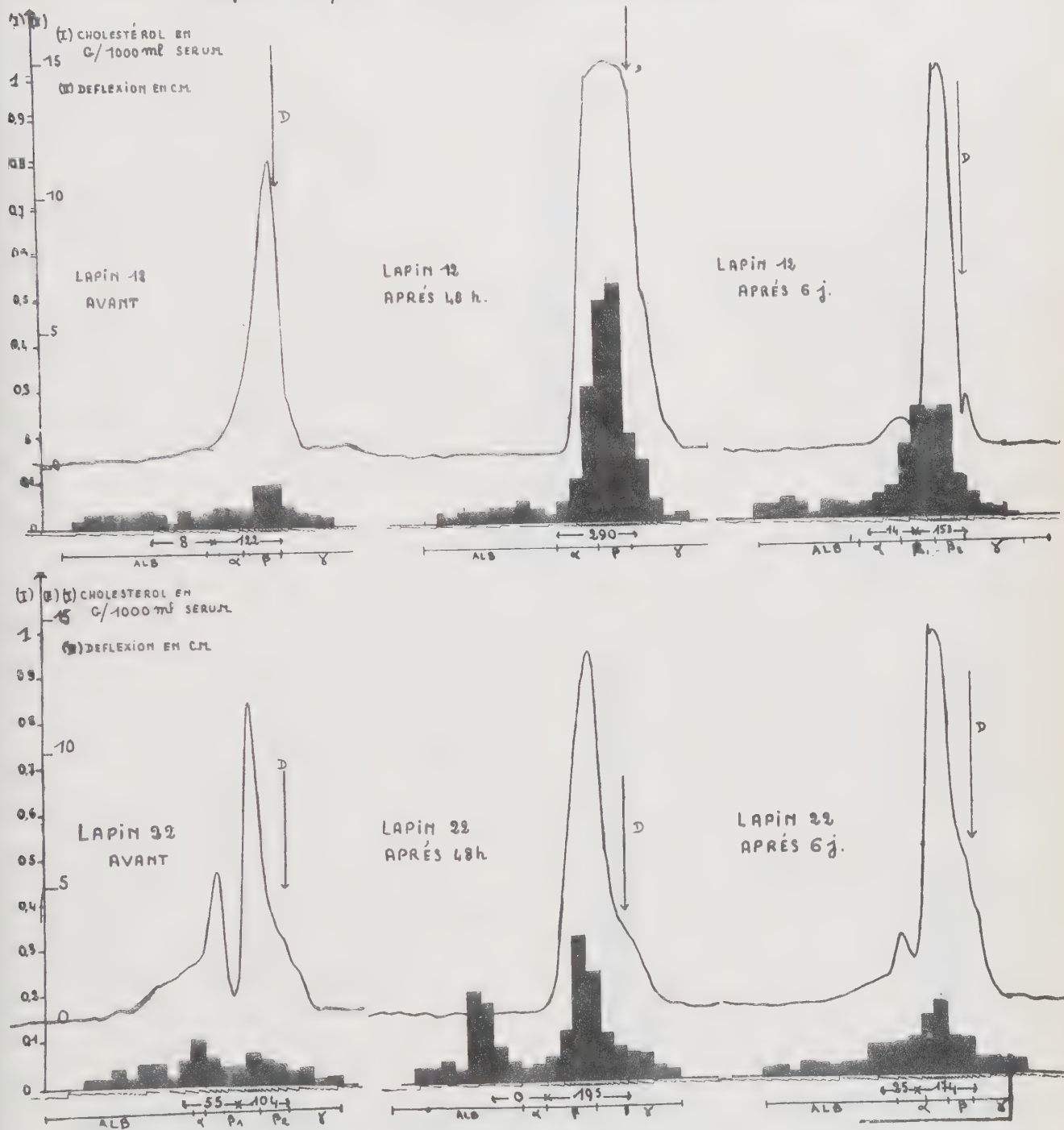
Contrairement à ce que nous avons noté jusqu'ici le γ cholestérol montre une augmentation appréciable, en effet 8 h après l'injection, il s'est élevé à 0,31 g alors qu'à l'origine il était de 0,06 g .

D . Conclusion

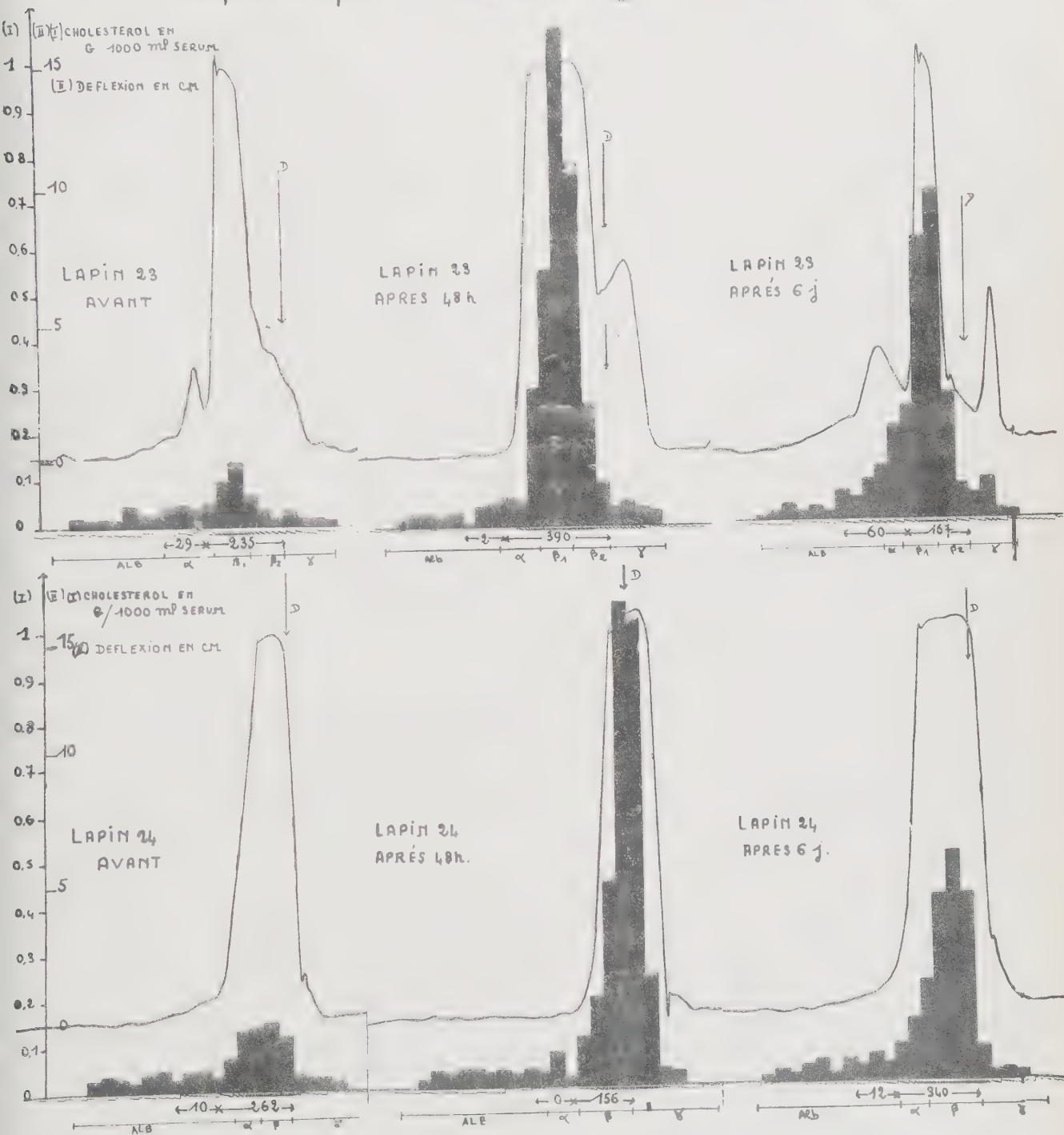
Les lapins réagissent très bien à une injection de Triton. Celle-ci déclenche une hypercholestérolémie spectaculaire qui porte principalement sur le β cholestérol et également un peu sur le γ cholestérol , alors que les autres fractions restent inchangées. L'histogramme montre, encore mieux que des chiffres, la constance de ces deux fractions .

Les lipoprotéines varient également mais dans des proportions bien moindres

Lapins ayant reçu une injection de Triton



Lapins ayant reçu une injection de Triton



ETUDE SUR LE RAT

I . RAT NORMAL

A . INTRODUCTION

Nous avons montré dans les expériences précédentes que notre méthode était facilement applicable au sérum de lapin normal et à plus forte raison hypercholestérolémique ; cependant, le lapin n'est pas le seul animal utilisé dans les recherches expérimentales sur l'athérosclérose, de très nombreuses données ont été étudiées sur le rat qui a une cholestérolémie et une lipémie parmi les plus basses chez les animaux (LABROUSSE 1962) .

Dans ce chapitre, nous allons vérifier d'abord si la méthode décrite est applicable au sérum de rat normal puis nous suivrons les variations du cholestérogramme après une injection de Triton .

B . CONSTANTES BIOLOGIQUES DU RAT NORMAL

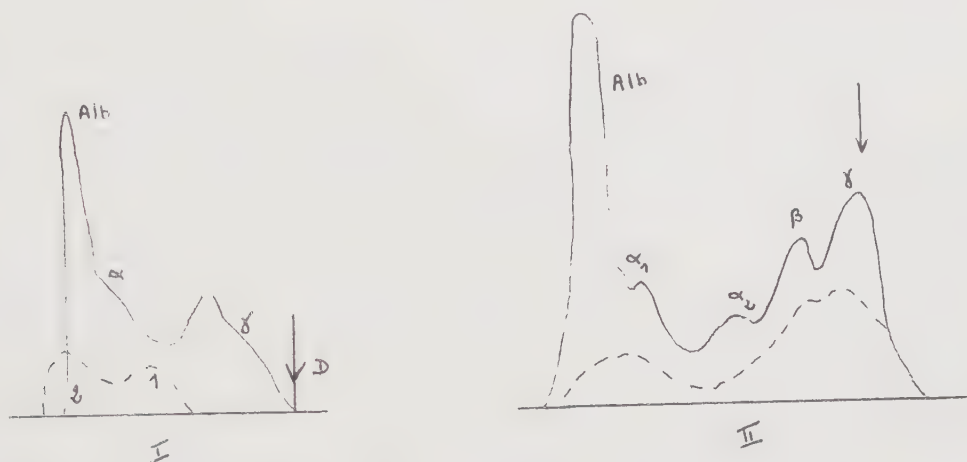
LEMAIRE et COTTET 1957 employant la méthode de DELSAL donnent comme chiffre moyen de cholestérol pour des animaux adultes (12 semaines) 0,43 ‰ et 2,33 ‰ pour les lipides totaux .

Chez les rats plus âgés la lipémie augmente (3,28 g pour des rats de un an) .

BARGETON et COLL. par la méthode de SPERRY et WEBB trouvent comme cholestérolémie moyenne 0,58 g chez des rats de onze semaines .

En résumé le cholestérol chez le rat est environ quatre fois moindre que chez l'homme, et les lipides totaux sont abaissés de moitié .

Pour LEMAIRE et COTTET, les lipoprotéines du rat se présentent de façon nettement différente de celles de l'homme, il y a toujours deux pics mais le premier se trouve au niveau des globulines tandis que le plus important est situé au niveau des albumines et α globulines.



Protéinogramme et Lipidogramme de rat normal

I. Schéma donné par Lemaire et Cottet (électrophorèse de zone)

II. Schéma donné par Ribeiro et Coll.

La majeure partie du cholestérol est comprise dans la zone des lipoprotéines.

Pour RIBEIRO et Coll. (1961), le lipidogramme du rat est semblable à celui de l'homme, naturellement avec des valeurs plus faibles. Cette divergence des résultats s'explique par la difficulté de l'étude électrophorétique tributaire des conditions expérimentales (ENSELME 1954).

On rapporte dans les tableaux suivants le cholestérol contenu dans différentes fractions : fractions séparées par électrophorèse de zone (COTTET et LEMAIRE 1957) ou par ultracentrifugation (HILLYARD). Dans les deux cas les auteurs notent une quantité faible de β cholestérol (13 % pour l'un 15 % pour l'autre).

COTTET situe la proportion la plus importante au niveau des albumines tandis que HILLYARD trouve cette même proportion dans les α lipoprotéines. Ici encore interviennent les techniques différentes mises en oeuvre.

TABLEAU 35

Chiffres rapportés par COTTET et LEMAIRE

Le cholestérol est donné par rapport aux fractions correspondantes du protidogramme .

Rat n°	Cholestérol total g pour 1 000 ml	% du cholestérol dans les différentes fractions			
		Albumine	Globuline α	Globuline β	Globuline γ
1	0,56	100	0	0	0
2	0,71	100	0	0	0
3	0,80	74	0	5,7	20
4	0,69	53	0	46,5	0
M	0,69	82	0	13	5

Chiffres rapportés par HILLYARD et Coll.

Concentration des lipides et du cholestérol dans 4 fractions lipoprotéiniques .
Résultats exprimés en mg pour 100 ml sérum .

Lipoprotéine fraction	Lipides totaux	Cholestérol total	Cholestérol libre	Cholestérol extériorifié
A	61	15	4	1
B	71	34	7	27
C	113	48	6	42
D	40	1	1	0
Somme des fract.	285	98	18	80

15 % du cholestérol dans les β 85 % dans les α .

Nous allons exposer nos résultats cependant auparavant nous donnerons la technique de prélèvement du sang .

C . PRELEVEMENT DU SANG CHEZ LE RAT

On fait les prélèvements de sang dans le sinus orbital d'après la méthode utilisée par Monsieur le Professeur HALPERN auquel nous tenons à exprimer nos vifs remerciements . Nous en donnons une rapide description .

L'animal est immobilisé sur le côté gauche, la tête fermement maintenue entre le pouce et l'index . On peut ainsi ponctionner le sinus caverneux en introduisant une pipette Pasteur dans l'orbite droite . La pointe de cette pipette, effilée et rodée, longue de 2 cm est enfoncée dans l'angle interne de l'oeil en suivant une direction légèrement oblique : elle pénètre ainsi dans le sinus . On relève alors la pipette (préalablement rincée dans une solution d'héparine) dans laquelle le sang monte par capillarité .

On peut prélever ainsi 0,5 à 0,8 ml de sang que l'on met dans un tube semi-capillaire ce qui facilite le prélèvement du sérum après centrifugation .

D . RESULTATS CHEZ LE RAT NORMAL

Comme le rat a un taux de cholestérol faible, afin d'obtenir des résultats valables on a modifié quelque peu les conditions opératoires . Les électrophorèses sont faites en tampon T.E.B. avec des dépôts de 60 μ l, on s'est assuré, comme pour le lapin, que malgré la forte dose de sérum, l'ensemble des fractions cholestérolées correspondait au cholestérol total mesuré directement . La méthode de dosage du cholestérol dans les fractions électrophorétiques étudiée chez l'homme garde toute sa valeur en l'appliquant au rat . La migration s'effectue pendant 8 heures .

Pour les rats on n'a fait que 3 bandes d'électrophorèse par sérum, un lipidogramme, et deux bandes pour le dosage du cholestérol. Donc dans le cas du rat lorsqu'on parlera du cholestérol α ou β , il s'agira de celui lié au α et β lipoprotéines et non plus de celui migrant au niveau des α et β globulines ou des albumines comme chez l'homme et chez le lapin.

Une modification porte également sur le dosage, au lieu d'opérer séparément sur les deux bandes, on dose simultanément le cholestérol de ces deux bandes palliant ainsi à la sensibilité moindre lorsque les doses sont faibles ; naturellement les résultats sont divisés par deux. De plus comme le temps de migration a été réduit, le sérum s'est déplacé moins loin, ce qui fait que la bande a été divisée en 12 bandelettes du dépôt au albumines et en 4 de l'autre côté du dépôt.

Les résultats qu'on rapporte sont ceux obtenus sur 12 rats normaux, à jeûn depuis la veille, pesant entre 150 g et 250 g.

1. LIPIDOGRAMME (voir graphique)

Dans l'interprétation des résultats nous avons rencontré les difficultés déjà signalées par ENSELME. Du fait du temps de migration plus court, les fractions α et β lipoprotéines sont moins bien individualisées que dans le cas du lapin.

Cependant, on peut noter, en partant du dépôt, un premier pic élevé mais étroit, que nous appellerons β -lipoprotéines ; elles représentent environ 42 % des lipoprotéines totales. Puis il y a une seconde fraction pas toujours très nettement séparée du premier clocher, qui généralement est moins élevée, mais plus étalée que le premier clocher ; il s'agit des α -lipoprotéines (58 % des lipoprotéines totales).

2. CHOLESTEROL

Le cholestérol total moyen s'élève à 0,60 g avec de grandes variations individuelles.

TABLEAU 36

RESULTATS DU CHOLESTEROGRAMME CHEZ DES RATS NORMAUX

Rats	C.T. calculé	Cholestérol β		Cholestérol α		Cholest γ
		β total	CM β	β total	CM α	
1	0,57	0,25	0,10	0,28	0,06	0,02
2	0,38	0,12	0,04	0,19	0,04	0,08
3	0,44	0,16	0,07	0,27	0,07	0,01
4	0,59	0,23	0,11	0,33	0,09	0,01
5	0,98	0,40	0,14	0,44	0,12	0,13
6	0,93	0,38	0,15	0,50	0,14	0,03
7	0,59	0,27	0,15	0,27	0,08	0,03
8	0,54	0,31	0,10	0,21	0,07	0,01
11	0,44	0,11	0,03	0,28	0,05	0,05
12	0,56	0,19	0,06	0,34	0,08	0,02
13	0,60	0,21	0,07	0,34	0,07	0,05
14	0,69	0,22	0,06	0,56	0,09	0,04
M	0,60	0,22	0,09	0,33	0,08	0,04

C.T. = Cholestérol total exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

C.M. α = Cholestérol maximum des α lipoprotéines exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

C.M. β = Cholestérol maximum des β lipoprotéines exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

Les chiffres extrêmes étant 0,38 g et 0,98 g .

Si l'on examine l'histogramme du cholestérol, on constate tout d'abord qu'il n'y a pas de fractions individualisées . Le cholestérogramme se présente sous forme d'une courbe à un seul clocher .

En étudiant les fractions se rapportant au lipidogramme correspondant, on constate cependant que le cholestérol α est plus élevé que le cholestérol β , 0,33 g pour le premier contre 0,22 g pour le second (chiffres moyens), ce qui représente 55 % du cholestérol dans les α lipoprotéines et 37 % dans les β . La disparité entre les deux fractions est beaucoup moins grande que celle signalée par COTTET (1957) .

De plus, on peut remarquer que dans chacune de ces deux fractions, il se détache un pic .

Nous avons déjà mentionné ce fait lors de l'étude du cholestérol chez l'homme et chez le lapin, le β cholestérol est un clocher avec un maximum que nous avons appelé "cholestérol β maximum" . Dans le cas du rat on distingue un seul clocher cependant il existe ce qu'on pourrait appeler un "cholestérol β maximum" et un "cholestérol α maximum" . Ses deux pics ayant une importance à peu près égale .

E . Conclusion

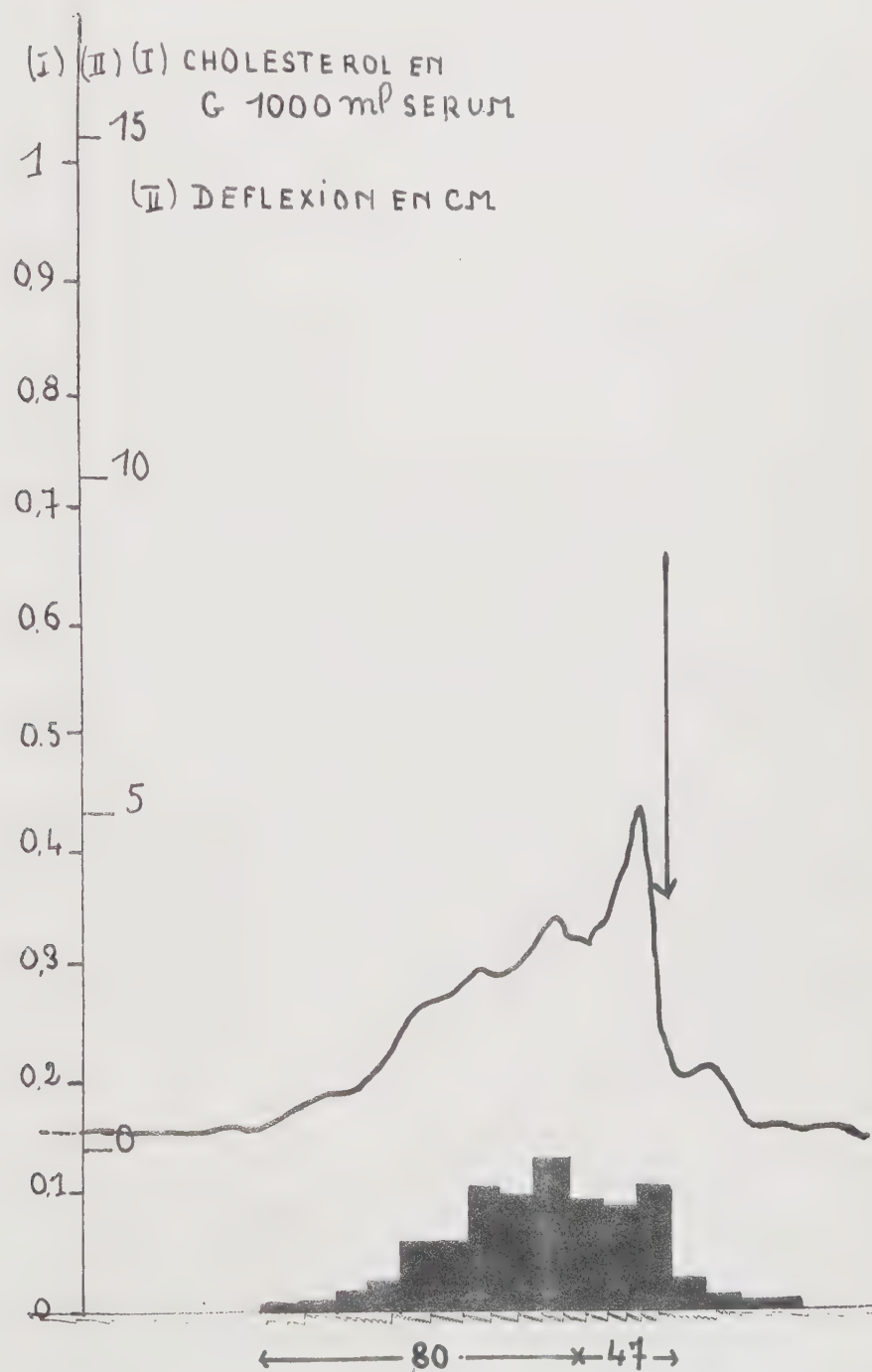
Le lipidogramme normal de rat est assez difficilement interprétable . Cependant on peut différencier des α et des β lipoprotéines . Les premières étant numériquement plus importantes que les secondes .

Le cholestérogramme se présente d'une façon compacte, on ne note pas comme chez l'homme un cholestérol β séparé du cholestérol α par une partie ne contenant pratiquement pas de lipides .

Nous donnons à la page suivante un lipidogramme et un cholestérogramme de rat normal .

Graphique

lipidogramme et cholestérogramme d'un
sérum normal de rat.



II . RAT RECEVANT DU TRITON

A . Expérience

La rat est un animal qui se défend très bien contre l'hyperlipémie et l'hypercholestérolémie ce qui explique la rareté des athéroscléroses spontanées et la difficulté de provoquer des lésions athéromateuses . Les régimes enrichis en cholestérol ne suffisent pas à eux seuls .

MALINOV et Coll. ajoutent au régime hypercholestérolé des antityroïdiens de synthèse .

D'autres auteurs (ENSELME 1956) combinent régime et hypertension . Des oestrogènes ont également été ajoutés (MOSKOWITZ 1956) .

Malgré ces artifices les lésions restent discrètes . Après l'hyperlipémie spectaculaire obtenue chez le lapin avec le Triton , nous avons utilisé ce produit chez le rat .

Quatre rats de 200 g reçoivent en injection intraveineuse, dans une veine de la queue, 150 mg/kg de Triton (WR 1339 - Laboratoire Winthrops) . On a fait une prise de sang, en utilisant le procédé décrit plus haut, avant l'injection, 48 heures et 6 jours après . On a choisi le même intervalle de temps que pour les lapins .

B . Résultats

Il faut remarquer tout d'abord que l'hyperlipémie et l'hypercholestérolémie sont beaucoup plus discrètes chez le rat que chez le lapin . C'est d'ailleurs ce que REBER avait déjà noté . Ceci est en accord avec ce que nous avons dit plus haut concernant la difficulté de susciter chez le rat une hyperlipémie et une hypercholestérolémie .

1 . Variation du lipidogramme

48 heures après l'injection, dans tous les cas, les lipoprotéines ont augmenté si l'on considère les unités densitométriques, on voit que de 105 avant l'injection, elles se sont élevées à 211 soit une augmentation moyenne de 114 % pour revenir à peu près à la valeur initiale 6 jours après (108) .

La courbe du lipidogramme subit également des modifications, chez le rat normal on avait un pic β élevé et étroit et une fraction α plus diffuse ; après injection de Triton, les deux fractions tendent à se rassembler et après 6 jours alors que quantitativement les lipoprotéines sont revenues à la normale, le lipidogramme présente une courbe altérée .

2 . Variation du cholestérol

Le cholestérol total est augmenté mais les rats réagissent de façon moins intense que le lapin à l'injection de Triton . En effet, le cholestérol total a doublé, de 0,57 g il passe à 1,16 g (dans le même temps, il avait triplé chez le lapin) et après 6 jours, il est pratiquement revenu à la normale (0,62 g) .

L'histogramme du cholestérol présente un seul clocher avec un pic maximum dans la fraction correspondant aux β lipoprotéines . La division ne peut se faire que grâce aux repères fournis par le lipidogramme .

L'augmentation porte sur la fraction β et γ du cholestérol alors que le cholestérol α diminue (différence de réaction entre le rat et le lapin) . Le cholestérol β s'élève de 0,25 g avant injection à 0,45 g 48 heures après l'injection, et 6 jours après, alors que le cholestérol total est revenu à la normale, il est encore de 0,41 g .

Le cholestérol maximum suit la même évolution et passe de 0,05 g à 0,15 g 48 heures après injection, taux auquel il est encore 6 jours après, comme chez le lapin le cholestérol β maximum augmente plus rapidement que le cholestérol β total .

TABLEAU 37

VARIATIONS DU CHOLESTEROGRAMME ET DU LIPIDOGRAMME

APRES UNE INJECTION DE TRITON

RAT 11

	L. P	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest γ
			β total	CM β		
avant triton	56	0,44	0,11	0,03	0,28	0,05
48 h après	157	0,86	0,37	0,13	0,30	0,19
6 jours après	170	0,36	0,18	0,09	0,11	0,06

RAT 12

	L. P.	C. T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest γ
			β total	CM β		
avant triton	132	0,56	0,19	0,06	0,34	0,02
48 h après	195	0,86	0,45	0,18	0,35	0,20
6 jours après	65	0,45	0,26	0,11	0,11	0,08

L. P. = lipoprotéines totales exprimées en unités densitométriques

C. T. = cholestérol total exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

C. M. β = cholestérol maximum exprimé en g pour 1 000 ml de sérum

Cholestérol α , β , γ , sont donnés par rapport au lipidogramme

TABLEAU 38

VARIATIONS DU CHOLESTEROGRAMME ET DU LIPIDOGRAMME
APRES UNE INJECTION DE TRITON

RAT 13

	L.P.	C.T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest γ
			β total	CM β		
avant triton	124	0,60	0,21	0,07	0,34	0,05
48 h après	230	1,02	0,50	0,15	0,26	0,26
6 jours après	95	0,79	0,61	0,17	0,11	0,07

RAT 14

	L.P.	C.T. calculé	Cholestérol β		Cholest α	Cholest γ
			β total	CM β		
avant triton	110	0,69	0,10	0,06	0,56	0,04
48 h après	265	0,78	0,48	0,17	0,28	0,03
6 jours après	102	0,88	0,60	0,23	0,25	0,03

Alors qu'il représente le $1/5$ avant injection, 48 heures après il est égal au $1/2$ du cholestérol β total .

Le cholestérol α s'abaisse de 0,38 g (taux moyen avant injection à 0,29 g puis 0,14 g . Le cholestérol γ s'élève après 48 heures . Il passe de 0,04 g à 0,17 g pour revenir à la normale après 6 jours (0,06 g) .

D . Conclusion

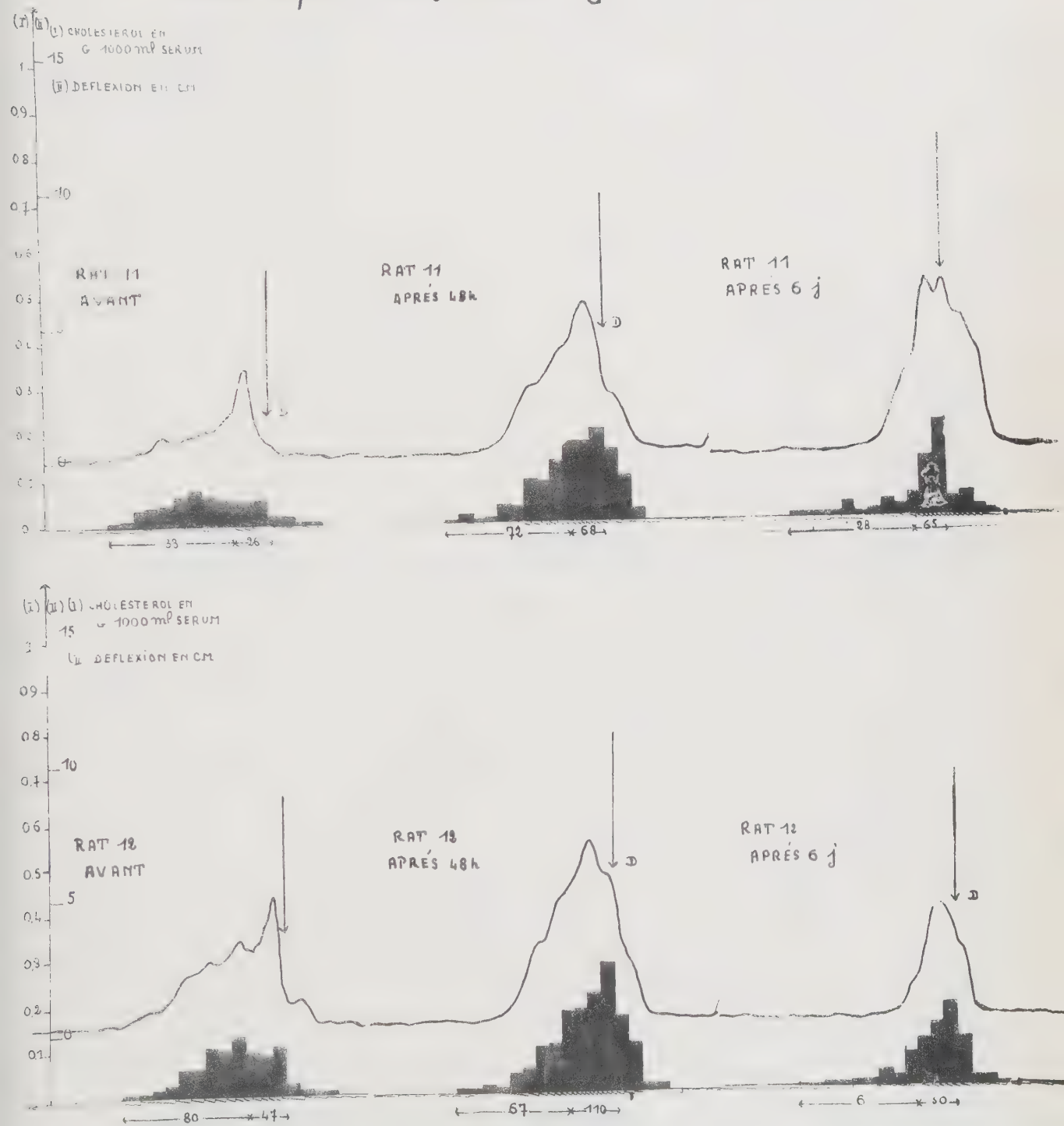
Le Triton provoque chez le rat une hyperlipémie mais surtout une hypercholestérolémie .

Cette injection semble causer des perturbations plus profondes que chez le lapin . En effet, 6 jours après l'injection le lipidogramme présente une image altérée .

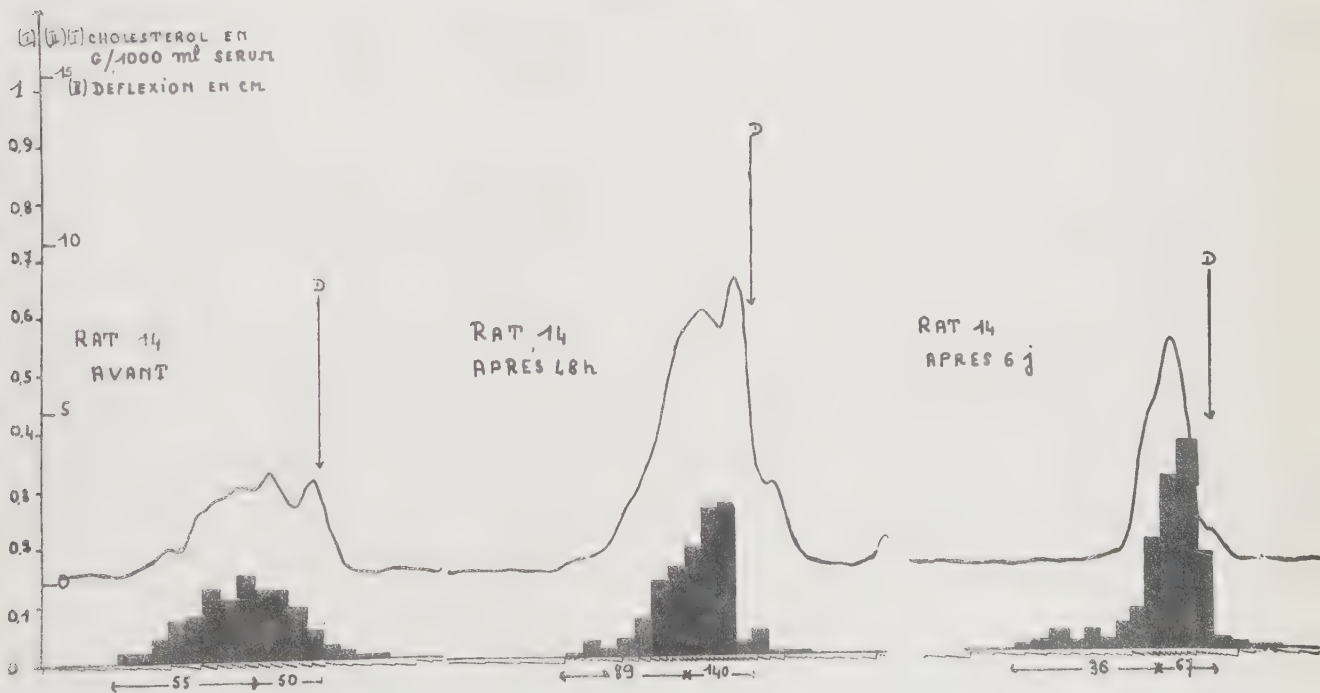
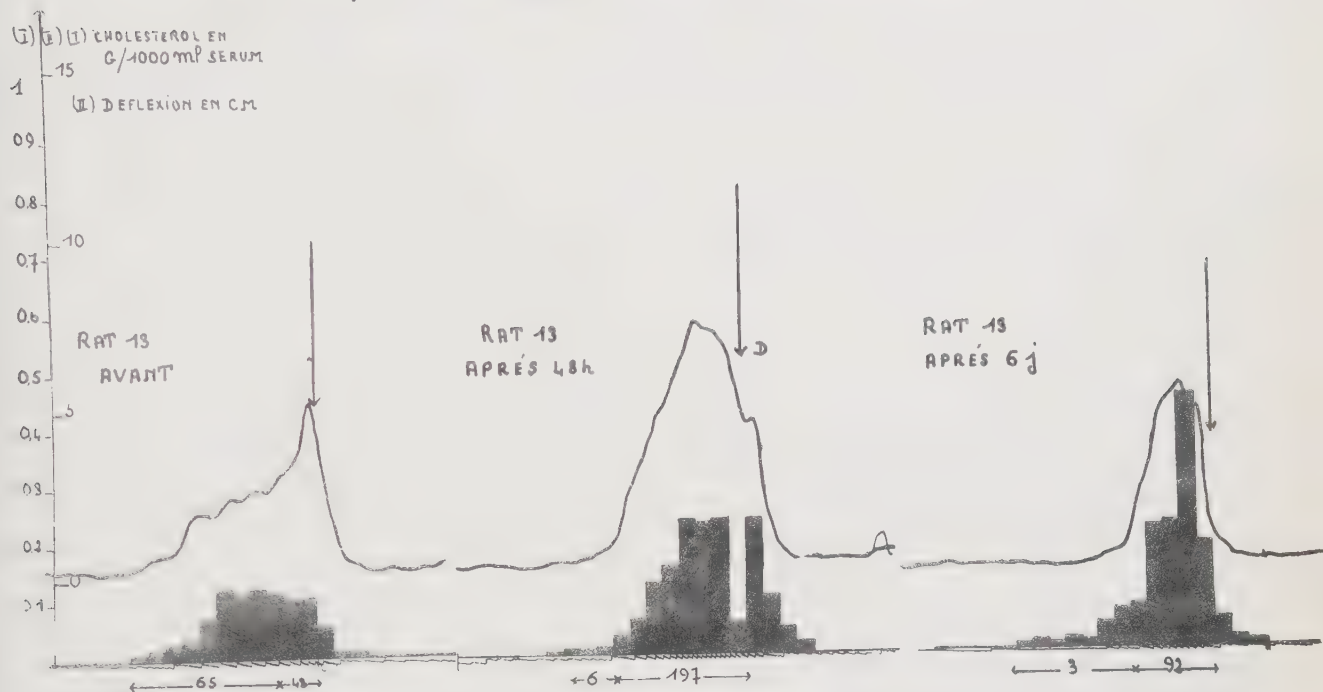
L'histogramme du cholestérol montre également de profondes modifications qui persistent 6 jours après l'injection .

Le cholestérol β augmente et reste élevé ainsi que le cholestérol β maximum tandis que le cholestérol α s'abaisse et continue de diminuer 6 jours après . Seul le cholestérol γ après une augmentation passagère revient à la normale dans ce même laps de temps .

Rats ayant reçu une injection de Triton



Rats ayant reçu une injection de Triton



CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail, nous avons mis au point une méthode de dosage du cholestérol sur bande d'électrophorèse .

1 . Cette méthode est rapide : elle supprime le stade extraction et permet le dosage du cholestérol sur 20 fractions différentes ce qui couvre toute l'électrophérogramme .

2 . Nous avons constaté chez le sujet normal la présence de cholestérol seulement dans les α et β lipoprotéines mais également dans la région des albumines et γ globulines . Le cholestérol albumine étant d'ailleurs supérieur au cholestérol α .

3 . Le cholestérol β qui représente la plus grande partie du cholestérol n'est pas un tout homogène, il s'en détache un pic que nous avons appelé cholestérol β maximum qui à lui seul compte 45 % du cholestérol β et qui semble subir des variations caractéristiques dans les syndrômes d'athérosclérose .

4 . Cette méthode est applicable au sérum de lapin qui donne un histogramme du cholestérol semblable à celui de l'homme bien que beaucoup moins accentué .

Dans les hypercholestérolémies que nous avons provoquées, l'augmentation du cholestérol total ne se répercute pas tout le long du cholestérogramme, mais seulement sur la fraction β cette augmentation touche le β cholestérol total et également dans les mêmes proportions le cholestérol β maximum . Cette constatation est intéressante dans la mesure où elle permettrait encore une simplification de méthode .

5 . Avec quelques modifications cette méthode donne également un histogramme du cholestérol à partir du sérum de rat, celui-ci se présente de façon assez

différente de celui du lapin, les zones γ sont beaucoup moins nettement individualisées . Cette méthode permet de vérifier que chez le rat le cholestérol β est inférieur au cholestérol α mais dans l'hypercholestérolémie provoquée par le Triton c'est le cholestérol β qui augmente le plus nettement .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 . ADLESBERG (D.), SCHAEFFER (L.) and DRACHMAN (S.R.)
Development of hypercholestérolemia during cortisone and A.C.T.H.
therapy .
J. Amer. Med. Ass., 1950, 144, 909-914 .
- 2 . ANDERSON (J.T.) and KEYS (A.)
Cholesterol in serum and lipoprotein fractions .
Clin. Chem., 1956, 2, 145-159 .
- 3 . ANITSCHKOW (N.) and CHALATOW (S.)
Ueber experimentelle cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die
Entstehung einiger pathologischer Prozesse .
Zbl. Allg. Path. path. Anat. 1913, 24, 1-9 .
- 4 . ARDRY (R.), et DELAVILLE (M.)
Etude des conditions de validité de l'électrophorèse .
Ann. Biol. Clin., 1956, 14, 39-50 .
- 5 . ARONSON, GRÖNWALL (A.)
Separation of serum Proteins in paper electrophoresis . A new
electrophoresis buffer .
Scand. J. Lab. Invest., 1957, 9, 338-341 .
- 6 . ASSOUS (E.F.) et GIRARD (L.G.)
Microméthode nouvelle de dosage du cholestérol libre et du cholestérol
total directement sur le sérum sanguin .
Ann. Biol. Clin., 1962, 20, 973-986 .
- 7 . BARGERON (D.), KRUMM-HELLER (C.) et TRICAUD (M.E.)
Influence de l'âge et d'un acétate substitué sur le cholestérol sérique
chez le rat .
C.R. Soc. Biol., 1954, n° 1-2, 63 .
- 8 . BARR (D.P.)
Some chemical factors in the Pathogenis of atherosclerosis .
Circulation, 1953, 8, 641-654 .
- 9 . BARR (D.P.), RUSS (E.M.) and EDER (H.A.)
Protein lipid relationship in human plasma in artherosclerosis and
related conditions .
Am. J. Med., 1951, 11, 480-493 .

- 10 . BERGSTROM (S.), WINTERSTEINER (O.)
Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution . The nature of
products formed from cholesterol .
J. Biol. Chem., 1941 - 41 597-609 .
- 11 . BEST (M.), VAN LOON (E.J.), WATHEM (J.) and SEGER
Comparaison of serum cholesterol Methods .
Am. J. Med., 1954, 16, 601 .
- 12 . BLANCHINI (P.)
Lipid regulating activity of duodenal mucosa heparinoid .
Drug affecting lipid metabolism, Edit. Elsevier 1961, 604 p.
- 13 . BLOMBERG (B.M.), JANKELOWITZ (R.) and LAZARUS (F.)
A simple paper electrophoresis procedure for the determination of the
percentage concentration of serum α and β lipoproteins and their
cholesterol components .
South African J. Med. Sc., 1955, 20, 140 .
- 14 . BLOOR (W.R.), PELKAN (K.F.) and ALLEN (D.M.)
Determination of fatty acids and cholesterol in small amounts of blood
plasma .
J. Biol. Chem, 1922, 52, 191-205 .
- 15 . BOYDS (G.S.)
The estimation of serum lipoproteins . A micromethod based on zone
electrophoresis and cholesterol estimation .
Bioch. J., 1954, 58, 680-685 .
- 16 . BRAGDON (J.H.), HAVEL (R.J.) and BOYLE (E.)
Human serum lipoproteins chemical composition of four fractions .
J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 36-42 .
- 17 . BURSTEIN (M.)
Precipitation de β lipoprotéines sériques par l'héparine et les héparinoïdes
de synthèse à pH 5 .
C.R. Acad. Sc., 1957, 245, 586-587 .
- 18 . BURSTEIN (M.)
Sur la séparation des β -lipoprotéines du sérum après floculation par le
polyvinylpyrrolidone .
J. Physiol., 1961, 53, 519-524 .
- 19 . BURSTEIN (M.) et SAMAILLE (J.)
Sur une nouvelle méthode de dosage des β -lipoprotéines du sérum .
Path. Biol., C.R. Soc. Sav., 1956, 6, 543 .

- 20 . CHOW (B.F.), BURNETT (J.M.), LING (C.T.) and BARROWS (L.)
Effects of basal diet on the response of rats to certain dietary non-ionic active agents .
J. Nutr., 1953, 49, 563-577 .
- 21 . CLAUDE (J.R.), ANGUERRA (G.) et BEAUMONT (J.L.)
Etude comparée des méthodes de Grigaut, Zlatkis et Watson pour le dosage du cholestérol sérique .
Path. Biol., 1963, 2, 79-86 .
- 22 . COHN (E.J.), GURD (Fr.M.), SURGENOR (D.M.), BARNES (B.A.) et coll.
A system for the separation of the components of human blood .
Quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma .
J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 465 .
- 23 . COOK (D.L.), RAY (R.), DAVISSON (F.), FELDSTEIN (L.M.), CALVIN (L.D.) and GREEN (D.M.)
The effects of cholesterol dosage cortisone and D.C.A. on total serum cholesterol, lipoproteins and atherosclerosis in the rabbit .
Circulation, 1953, 7, 790 .
- 24 . COTTET (J.), ENSELME (J.) et LEMAIRE(A.)
Le syndrome biochimique lipido-protéinique d'un animal résistant à l'athérosclérose : le rat .
Presse Méd., 1957, 65, 1899-1902 .
- 25 . CRAWFORD (N.)
An improved method for the determination of free and total cholesterol using the ferric chloride reaction .
Clin. Chim. Act. 1958, 3, 357-367 .
- 26 . CRAWFORD (N.)
The determination of serum α and β -lipoprotein cholesterol .
Clin. Chim. Act., 1959, 4, 494-502 .
- 27 . DANGERFIELD (W.G.) and SMITH (E.B.)
An investigation of serum lipids and lipoproteins by paper electrophoresis .
J. Clin. Path., 1955, 8, 132-139 .
- 28 . DE GENNES (J.L.), POLONOWSKI (J.)
Les lipoprotéines sériques . Techniques de fractionnement .
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1958, 3, 275-288 .
- 29 . DELSAL
Dosage pondéral simultané des lipides sanguins et des protides totaux .
Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 99 .

- 30 . DURY (A.) and DI SUZIO (N.R.)
Effects of cortisone and epinéphrine exhibition on lipid components and phospholipid turnover in plasma liver and aorta of rabbits .
Am. J. Physiol., 1955, 182, 45-50 .
- 31 . DURY (A.)
Influence of cortisone on lipid distribution and atherogenesis .
Ann. N.Y. Acad. Sc., 1959, 72, 870-883 .
- 32 . DURRUM (E.L.), PAUL (M.H.) and SMITH (E.R.)
Lipid detection in paper electrophoresis .
Science, 1952, 116, 428-430 .
- 33 . ENSELME (J.), TIGAUD (J.), LAMBERT (R.) et COTTET (J.)
Recherches électrophorétiques sur les protéines du sérum de rat .
Etude statistique des résultats .
Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 1599-1609 .
- 34 . ENSELME (J.), COTTET (H.) et TIGAUD (J.)
Recherches électrophorétiques sur les protéines de rats hypertendus soumis à un régime hypercholestérolé .
Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 1185-1192 .
- 35 . FASOLI (A.)
Electrophoresis of serum lipoproteins on filter paper .
Acta Med. Scand., 1953, 145, 233-235 .
- 36 . FERRAND (P.) et RIEFFEL (C.)
Etude de la méthode de Zak pour le dosage du cholestérol sérique par la réaction de Zlatkis et Zak .
Ann. Biol. Clin., 1959, 16, 299-307
- 37 . FIGUEROA (I.S.) and PIKE (R.L.)
An ultramicro method for the determination of total serum cholesterol .
Analyt. Biochem., 1960, 2, 103-106 .
- 38 . FRANTZ (I.D.) and HINKELMAN (B.T.)
Acceleration of hepatic cholesterol synthesis by Triton WR 1339 .
J. Exptl. Med., 1955, 101, 225-232 .
- 39 . FRIEDMAN (M.) and BYERS (S.O.)
Mechanism underlying hypercholesterolemia induced by Triton WR 1339 .
Am. J. Physiol., 1957, 190, 439-445 .

- 40 . FRIEDMAN (M.) and BYERS (S.O.)
The mechanism responsible for the hypercholesteremia induced by
Triton WR 1339 .
J. Exptl. Med., 1953, 97, 117, 130 .
- 41 . FURST (V.) and LANGE (R.)
Evaluation of an acetic acid sulfuric acid .
Method for quantitative determination of cholesterol in serum .
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1954, 6, 60-64 .
- 42 . GARDNER (J.A.) and GAINSBOROUGH (H.)
Continued studies on cholesterol content of normal human plasma .
Attraction of the proteins of plasma for sterols .
Biochem. J., 1928, 21, 141-147 .
- 43 . GERTLER et coll.
Serum cholesterol and serum phospholipids in Health and in
coronary disease
J.A.M.A. 1950, 144-789
- 44 . GOULD (R.G.)
Lipid metabolism and atherosclerosis .
Am. J. Med., 1951, 2, 208-225 .
- 45 . GRIGAUT (A.)
Méthode de dosage de la cholestérine dans le sérum et dans les tissus .
Procédé colorimétrique .
C.R. Sco. Biol., 1911, LXX .
- 46 . GRASSMANN (W.), HANNIG (K.) and KNEDEL (M.)
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumpro-
teine auf filterpapier .
Dtsch. Med. Wschr., 1951, 76, 333-336 .
- 47 . GRASSMANN (W.) and HANNIG (K.)
Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch
Papierelktrophorese .
Hoppe-seyler's Z Physiol. Chem. 1952, 1, 290 .
- 48 . HAVEZ (R.)
Possibilités et limites de l'électrophorèse sur papier dans l'étude
des milieux biologiques humains .
Thèse Lille 1956 .
- 49 . HENLY (A.A.)
The determination of serum cholesterol .
Analyst., 1957, 82, 286-287 .

- 50 . HILLYARD (L.A.), ENTENMAN (C.), FEINBERG (H.) and CHAIKOFF (I.L.)
Lipid and protein composition of four fractions accounting for total serum lipoproteins .
J. Biol. Chem., 1955, 214, 79-90 .
- 51 . JANICKI (B.W.) and ARON (S.A.)
Effect of Triton WR 1339 on lipoproteins and lipoproteine lipase of guinea-pig plasma .
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 109, 507-509 .
- 52 . JENCKS (W.P.) et DURRUM (E.L.)
Paper electrophoresis as a quantitative methods : the staining of serum lipoproteins .
J. Clin. Invest., 1953, 34, 1437 .
- 53 . JENCKS (W.P.), HYATT (M.R.), JETTON (M.R.), MATTINGLY (T.W.) et DURRUM (E.L.)
A study of serum lipoproteins in normal and artherioclerotic patients by paper electrophoretic techniques .
J. Chem. Invest., 1955, 35, 480 .
- 54 . JONES (C.M.), CULVER (P.J.), DRUMENCY (G.D.) and RYAN (A.E.)
Modification of fat absorption in the digestive tract by the use of an emulsifying agent .
Ann. Intern. Med., 1948, 29, 1-10 .
- 55 . JONES (H.B.), GOFMANN (J.W.), LUNDFREN (F.I.), LYON (T.P.), GRAHAM (D.M.), STRISOWER (B.) and NICHOLS (A.V.)
Lipoproteins in atherosclerosis .
Am. J. Med., 1951, 11, 358-380 .
- 56 . KLUNGSOYR (L.), HANKENES (E.) and CLOSS (K.)
A method for the determination of cholesterol in blood serum .
Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 514-518 .
- 57 . KOBERNICK (S.O.) and MORE (R.H.)
Diabetic state with lipaemia and hydropic changes in the pancreas produced in rabbits by cortisone.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, 74, 602-605 .
- 58 . KUNKEL (H.G.), ARHENS (E.H.) and EISENMENGER (W.J.)
Application of turbidimetric method for estimation of gamma globulin and total lipid to study of patients with liver disease .
Gastroenterology, 1948, 11, 499-507 .
- 59 . KUNKEL (H.G.) et SLATER (R.J.)
Lipoproteins patterns of serum obtained by zone electrophoresis .
J. Clin. Invest., 1952, 31, 677-684 .

- 60 . KUNKEL (H.G.) and TRAUTMAN (R.)
The α_2 lipoproteins of human serum correlation of ultracentrifugal and electrophoretic properties .
J. Clin. Invest., 1956, 35, 641-648 .
- 61 . LABROUSSE (A.)
Contribution à l'étude de l'athérosclérose animale spontanée et expérimentale .
Thèse Vétérinaire - Lyon, 1962 .
- 62 . LANGAN (T.A.), DURRUM (E.L.) and JENCKS (W.P.)
Paper electrophoresis as quantitative method : measurement of α and β lipoprotein cholesterol .
J. Chem. Invest., 1955, 34, 1427-1436 .
- 63 . LEMAIRE (A.) et COTTET (J.)
Le syndrome biochimique de l'athérosclérose animale .
Presse Méd., 1955, 63, 1339-1341
- 64 . LEVER (W.F.), GURD (F.R.M.), UROMA (E.), BROWN (R.K.), BARNES (B.A.), SMITD (K.) and SCHULTZ (E.)
Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation ; quantitative separation and determination of the protein components in amounts of normal human plasma .
J. Clin. Invest., 1951, 30, 99-111 .
- 65 . LINDGREN (F.T.), NICHOLS (A.V.), HAYES (T.L.), FREEMAN (M.K.) and GOFMAN (J.W.)
Structure and homogeneity of the low density serum lipoproteins .
Ann. N.Y. Acad. Sc., 1959, 72, 826-844 .
- 65 . MACHEBOEUF (M.)
bis Recherches sur les composés phosphorés du sang normal .
Thèse Médecine. Paris 1928 .
- 66 . MACINTYRE (I.) and RALSTON (M.)
Direct determination of serum cholestérol .
Biochem. J., 1954, 56, XLIII .
- 67 . MALINOV (M.R.), HOJMAN (D.) and PELLEGRINO (A.)
Different methods for the experimental production of generalized atherosclerosis in the rat .
Acta Cardiol., 1954, 9, 480-498 .
- 68 . MALINOV (M.R.), HOJMAN (D.) and PELLEGRINO (A.A.)
Spontaneous atherosclerosis in the rat .
Arch. Path. 1956, 61, 11-19 .
- 69 . MEYER (N.)
Fractionnement du cholestérol du sérum par électrophorèse de zone .
Etude des fractions cholestérolées chez l'homme normal et dans l'athérosclérose . Thèse Paris, 1964 .

- 70 . MOSKOWITZ (M.S.), MOSKOWITZ (A.A.), BRADFORD (W.L.) and
WISSLER (R.W.)
Changes in serum lipids and coronary arteries of the rat in response to
estrogens .
Arch. Pathol., 1956, 61, 245-263 .
- 71 . NICOLAS (J.P.)
Communication orale, 1963 .
- 72 . NIKKILA (E.)
Studies on the lipid protein relationship in normal and pathologica sera
and the effect of heparin on serum lipoproteins .
Scand. J. Clin. Invest., 1953, 5, suppl. 8 .
- 73 . NURY (F.S.) and SMITH (E.R.)
Alpha and beta lipoprotein cholesterol .
Method of rapid quantitative determination .
Clin. Chem., 1957, 3, 110-115 .
- 74 . ONCLEY (J.L.), GURD (F.R.N.) and MELIN (M.)
Composition and properties of human serum lipoproteins .
J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 458 .
- 75 . PIERFITTE (M.) et BARRIER (J.)
Microdosage du cholestérol sérique par une réaction du chlorure ferrique .
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1959, 40, 31-39 .
- 76 . POLONOWSKI (J.) CHEFTEL (R.I.) MORETTI J..
études des peptides associés aux phospholipides du sérum humain
Bull. Soc. Chim. biol. Par. 1957 39 - 291 299 .
- 77 . POLONOWSKI (J.), JARRIER (M.), PETIT (M.) et DUPUY (C.)
Méthode simple d'analyse des lipides, des α et β lipoprotéines plasma-
tiques .
Ann. Biol. Clin., 1959, 16, 69,72 .
- 78 . RACADOT (A.)
Application à la pathologie de l'électrophorèse en Tampon .
Tris - E.D.T.A. - borate - Thèse Nancy, 1960 .
- 79 . RAPP (R.D.) and MENINGER (M.N.)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane as an electrophoresis buffer .
Am. J. Clin. Path., 1959, 31, 400-403 .

- 80 . REBER (K.) and STUDER (A.)
Experimental lipemia and attempts to its control .
Drugs affecting lipid metabolism, Elsevier, 1961, 604 p.
- 81 . RIBEIRO (L.P.), MITIDIERI (E.) and AFFONSO (O.R.)
Paper electrophoresis . A review of methods and results .
Elsevier Publishing Cy, 1961, 464 p.
- 82 . RUSS (E.M.), EDER (H.A.) and BARR (D.P.)
Protein lipid relationships in human plasma in normal individuals .
Am. J. Med., 1951, 2, 468-479 .
- 83 . SCANU (A.) and PAGE (I.H.)
Plasma transport of lipids and lipoprotein proteins in dogs treated with
Triton WR 1339 .
J. Clin. Invest., 1962, 41, 495-504 .
- 84 . SCANU (A.) and SZAJEWSKI (J.M.)
Plasma free fatty acids in dogs treated with Triton WR 1339 .
Am. J. Physiol., 1961, 201, 1035-1041 .
- 85 . SCHOENHEIMER (R.) and SPERRY (W.N.)
Micromethod for determination of free and combined cholesterol .
J. Biol. Chem., 1934, 106, 745-760 .
- 86 . SEARCY (R.L.), BERGQUIST (L.M.) and JUNG (R.C.)
Rapid staining of serum lipoprotein electrophoregrams .
Clin. Chim. Acta. , 1960, 5, 449-450 .
- 87 . SEARCY (R.L.), and BERGQUIST (L.M.)
A new color reaction for the quantitative of serum cholesterol .
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 192-199 .
- 88 . SEARCY (R.L.) and BERGQUIST (L.M.)
Fluorescent detection of serum lipoproteins .
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 941-942 .
- 89 . SEARCY (R.L.), CRAIG (R.G.) and BERGQUIST (L.M.)
Chromatographic estimations of serum lipoproteins cholesterol .
Clin. Acta, 1961, 6, 475-480 .
- 90 . SEIFTER (J.) and BAEDER (H.)
Lipid mobilization by a crystalline peptide isolated from plasma of horses
administered cortisone .
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1957, 95, 469-471 .

- 91 . SOULIER (J.P.) et ALAGILLE (D.)
Etude des lipoprotéines dans l'athérosclérose humaine et expérimentale
par l'électrophorèse et des réactions non spécifiques des protéines .
Effet de l'héparine .
Sem. Hôp. Paris, 1953, 29, 3171-3181 .
- 92 . SPERRY (W.M.) and WEBB (M.)
Revision of Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination .
J. Biol. Chem., 1950, 187, 97-106 .
- 93 . SPINCO
Technical Bulletin 6095 A, Nov. 1961, p. 12-13 .
- 94 . STEINBERG
Communication orale . Oxford Juillet 1963 .
- 95 . SWAHN (B.)
Studies on blood lipid's .
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, 4, 98 et 1953, 5, suppl. 9, 1-114 .
- 96 . URIEL (J.) et GRABAR (P.)
Etude des lipoprotéines sériques par électrophorèse en gélose et l'analyse
immunoélectrophorétique .
Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 1253 .
- 97 . WILLIAMS (F.), PICKELS (E.) et DURRUM (E.)
Science, 1955, 121, 829 .
- 97 . WOLFF (R.) et BRIGNON (J.J.)
bis Recherches expérimentales sur la résorption intestinale du
cholestérol chez le lapin .
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956 . 38, 99-109 .
- 98 . WOLFF (R.), BRIGNON (J.J.) et NICOLAS (J.P.)
Recherches sur les lipoprotéines séparées par électrophorèse sur papier
en milieu tampon Tris . E.D.T.A. - Borate dans les sérums normaux
et pathologiques - Ann. Biol
Ann. Biol. Clin., 1963, 21, 15-28 .
- 99 . WUNDERLY (Ch.)
Electrophorèse sur papier .
Vigot Frères Edit. Paris 1956 .
- 100 . ZACK (B.)
Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol .
Am. J. Clin. Path., 1957, 27, 583-588 .
- 101 . ZLATKIS (A.), ZAK (B.) and BOYLE (A.J.)
A new method for the direct determination of serum cholesterol .
J. Lab. Clin. Med., 1953, 41, 486-492 .

TABLE DES MATIERES

1ère PARTIE

DESCRIPTION ET MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DU
CHOLESTEROL SUR ELECTROPHEROGRAMME.

<u>INTRODUCTION</u>	1
I - HISTORIQUE	3
II - ELECTROPHORESE	5
A) <u>Matériel et réactifs</u>	5
1) Appareil	5
2) Papier	6
3) Tampon	6
4) Coloration : a) Protidogramme	7
b) Lipidogramme	7
5) Lecture des bandes	8
B) <u>Justification de la méthode</u>	8
1) Electrophorèses pratiquées à la chambre froide	8
2) Tampon. Comparaison entre T.E.B. et Véronal	11
3) Le colorant	14
III - DOSAGE DU CHOLESTEROL	15
A) <u>Technique du dosage</u>	15
1) Réactifs	15
2) Dosage du cholestérol sur sérum total	16
3) Dosage du cholestérol dans les bandes délectrophorèses....	17
B) <u>Justification de la méthode</u>	20
1) Reproductibilité de la méthode	20

2) Sensibilité de la méthode	25
3) Stabilité de la coloration	25
4) Constance de la méthode	25
5) Extraction du cholestérol	27
a) Référence de la méthode	27
b) Capacité d'extraction de l'éluant	30
-) Saturation en cholestérol	33
-) Formation d'un vernis dû aux protéines	33
-) Extraction incomplète due au complexe formé par les lipoprotéines.....	33
5) Conservation du cholestérol.....	36
a) Conservation du cholestérol dans le sérum total	36
b) Conservation du cholestérol sur les bandes d'électrophorèse	39
c) Etude des variations du lipidogramme et du cholestérogramme en fonction de la conservation du sérum.	41
CONCLUSION	44

2ème PARTIE

FRACTIONS LIPOPROTEINIQUES ET CHOLESTEROLIQUES DANS LE SÉRUM DU SUJET NORMAL.

INTRODUCTION

I - LES LIPOPROTEINES	47
A) <u>Généralités sur les lipoprotéines</u>	47
1) Fractionnement chimique	47
2) Fractionnement par ultracentrifugation	48

3) Fractionnement électrophorétique	49
B) <u>Résultats personnels</u>	50
1) Choix des sujets et prélèvements	50
2) Représentation graphique du lipidogramme	51
3) Résultats numériques	51
II - CHOLESTEROL	54
A) <u>Généralités</u>	54
B) <u>Résultats personnels</u>	55
1) Corrélation entre <u>lipido</u> gramme et histogramme du cholestérol	57
2) Corrélation entre protéinogramme et histogramme du cholestérol	57
3) Etude des différentes fractions	58
4) Etude de l'histogramme	60
CONCLUSION	60

3ème PARTIE

ETUDE SUR L'ANIMAL :

INTRODUCTION.

- ETUDE SUR LE LAPIN -

I - QUELQUES CONSTANTES BIOLOGIQUES CHEZ LE LAPIN NORMAL	65
A) <u>Résultats donnés par différents auteurs</u>	65
B) <u>Résultats personnels</u>	67
1) Lipides totaux	65
2) Lipidogramme	68

3) Le cholestérol	70
II - INGESTION DE CHOLESTEROL	72
A) <u>Expériences de différents auteurs</u>	72
B) <u>Description de l'expérience</u>	73
C) <u>Résultats</u>	74
1) Variation du lipidogramme	74
2) Variations du cholestérogramme	74
D) <u>Conclusion</u>	79
III - INJECTION DE CORTISONE	79
A) <u>Travaux de différents auteurs</u>	79
B) <u>Expérience personnelle</u>	80
C) <u>Résultats</u>	81
1) Variation du lipidogramme	81
2) Variations du cholestérogramme	84
D) <u>Conclusion</u>	89
IV - INJECTION DE TRITON	89
A) <u>Travaux de différents auteurs</u>	89
B) <u>Expérience personnelle</u>	90
C) <u>Résultats</u>	91
1) Variations du lipidogramme	91
2) Variations du cholestérogramme	91
D) <u>Conclusion</u>	95

- <u>ETUDE SUR LE RAT</u> -	98
I - RAT NORMAL.....	98
A) <u>Introduction</u>	98
B) <u>Constantes biologiques du Rat normal</u>	98
C) <u>Prélèvement du sang chez le Rat</u>	101
D) <u>Résultats chez le Rat normal</u>	101
1) <u>Lipidogramme</u>	102
2) <u>Cholestérol</u>	103
E) <u>Conclusion</u>	104
II-- INJECTION DE TRITON	106
A) <u>Expériences</u>	106
B) <u>Résultats</u>	106
1) <u>Variations du lipidogramme</u>	107
2) <u>Variations du cholestérol</u>	107
D) <u>Conclusion</u>	110
CONCLUSIONS GENERALES.....	113

Vu

Nancy, le 20 Janvier 1964

Président de Thèse

Professeur KAYSER

Vu et approuvé

Nancy, le 26 Janvier 1964

Le 1 oyen

Professeur BERNANOSE

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 27 Janvier 1964

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS

